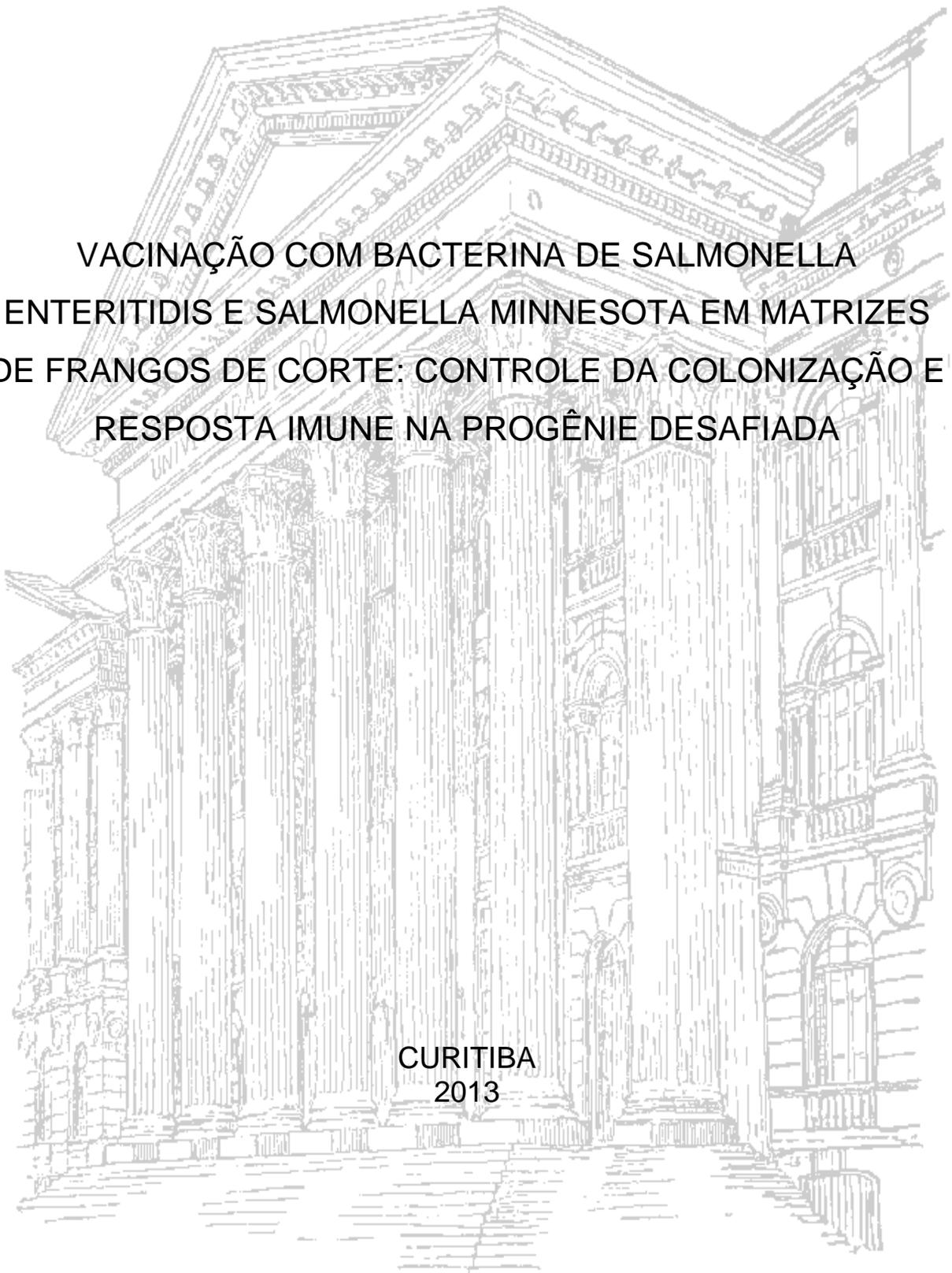


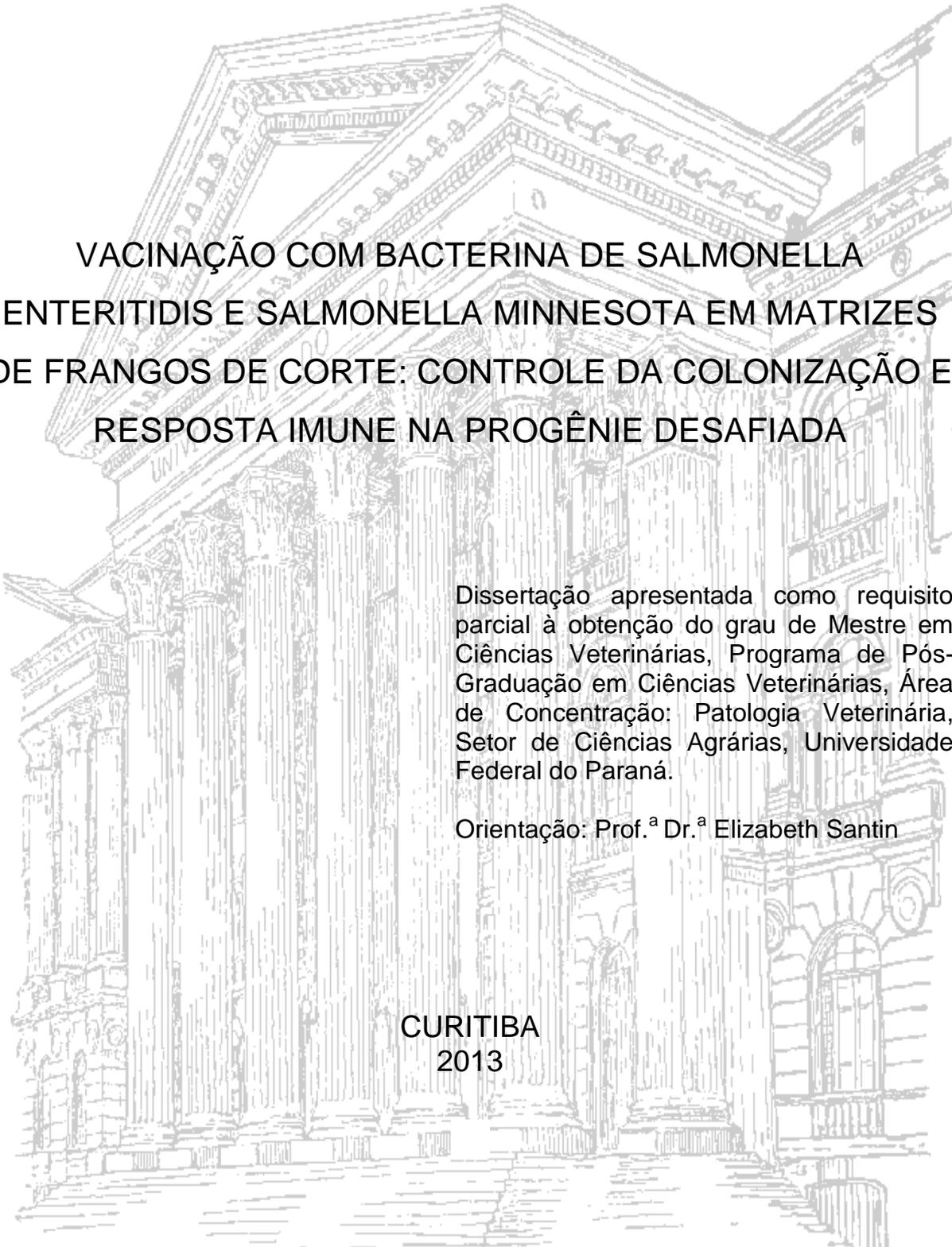
ALEXANDRE MIGUEL DE SOUZA

VACINAÇÃO COM BACTERINA DE SALMONELLA  
ENTERITIDIS E SALMONELLA MINNESOTA EM MATRIZES  
DE FRANGOS DE CORTE: CONTROLE DA COLONIZAÇÃO E  
RESPOSTA IMUNE NA PROGÊNIE DESAFIADA

CURITIBA  
2013



ALEXANDRE MIGUEL DE SOUZA



VACINAÇÃO COM BACTERINA DE SALMONELLA  
ENTERITIDIS E SALMONELLA MINNESOTA EM MATRIZES  
DE FRANGOS DE CORTE: CONTROLE DA COLONIZAÇÃO E  
RESPOSTA IMUNE NA PROGÊNIE DESAFIADA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Santin

CURITIBA  
2013

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



### PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “ESTUDO DA EFICÁCIA DA VACINAÇÃO COM BACTERINA DE SALMONELLA ENTERITIDIS E MINNESOTA EM MATRIZES DE FRANGOS DE CORTE SOBRE O CONTROLE DA COLONIZAÇÃO NA PROGENIE DESAFIADA COM ESSAS BACTERIAS VIVAS” apresentada pelo Mestrando **ALEXANDRE MIGUEL D SOUZA** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato Aprova do para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 20 de dezembro de 2013

Professora Dra. Elizabeth Santin  
Presidente/Orientadora

Dr. Mario Sergio Assayag Junior  
Membro

Professor Dr. Luiz Felipe Caron  
Membro

## **AGRADECIMENTOS**

À Profª. Drª. Elizabeth Santin, pela paciência e orientação.

Aos amigos do LABMOR, Eduardo, Patrick e Maristela, pelo auxílio durante o experimento.

Um agradecimento especial a Mariana, Dany e Rocio pela ajuda com a finalização do trabalho.

Ao professor Luiz Felipe Caron, pela recomendação ao Programa.

À empresa JBS Foods por concordar com a realização do curso e contribuir com a realização do experimento.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
<b>CAPÍTULO 1 – VACINAS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE À</b>	
<b><i>SALMONELLA</i> .....</b>	<b>16</b>
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO .....	19
<b>MECANISMOS IMUNOLÓGICOS RELACIONADOS À PERSISTÊNCIA E</b>	
<b>EXCREÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>RESPOSTAS IMUNES ÀS INFECÇÕES POR <i>SALMONELLA</i> EM AVES .....</b>	<b>26</b>
Imunidade Humoral .....	28
Imunidade Celular .....	30
Imunidade Passiva .....	31
<b>VACINAS COMO ALTERNATIVAS AO CONTROLE DE <i>SALMONELLA</i>.....</b>	<b>32</b>
Vacinas Vivas Atenuadas.....	34
Vacinas Inativadas .....	35
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 2 - VACINAÇÃO COM BACTERINA DE <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS</b>	
<b>E <i>SALMONELLA</i> MINNESOTA EM MATRIZES DE FRANGOS DE CORTE:</b>	
<b>CONTROLE DA COLONIZAÇÃO E RESPOSTA IMUNE NA PROGÊNIE</b>	
<b>DESAFIADA.....</b>	<b>48</b>
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	50
INTRODUÇÃO .....	51
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
Animais e Tratamentos Experimentais .....	52
Coleta de Material para Análises.....	54

Preparo e Inoculação das Cepas .....	54
Análises Microbiológicas .....	55
Análises Histológicas e Imunoistoquímicas .....	56
Análise Estatística .....	57
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
Microbiologia .....	58
Imunoistoquímica .....	61
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>72</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>77</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>80</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>80</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Tratamentos Experimentais. ....	53
<b>TABELA 2.</b> Contagem de <i>salmonella</i> em fragmentos de fígado nos diferentes tratamentos.....	59
<b>TABELA 3.</b> Porcentual de amostras positivas em fragmentos de ceco nos diferentes tratamentos.....	60
<b>TABELA 4.</b> Porcentual de amostras positivas em fragmentos de papo aos 21 dias de idade.....	61
<b>TABELA 5.</b> Média e erro padrão da contagem de células CD4+ e CD8+ em íleo e ceco de frangos de corte às 0 horas de idade nos diferentes tratamentos: .....	62
<b>TABELA 6.</b> Média e erro padrão da contagem de células caliciformes, CD4+ e CD8+ em íleo e ceco de frangos de corte aos 3 dias de idade nos diferentes tratamentos, .....	63
<b>TABELA 7.</b> Média e erro padrão da contagem de células caliciformes, CD4+ e CD8+ em íleo e ceco de frangos de corte aos 7 dias de idade nos diferentes tratamentos:: .....	68

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE frente a diferentes desafios, aos 3 dias de idade.....	65
<b>FIGURA 2.</b> Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE+ SM frente a diferentes desafios, aos 3 dias de idade. ....	65
<b>FIGURA 3.</b> Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM não desafiados, aos 3 dias de idade.....	66
<b>FIGURA 4.</b> Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM desafiados com SE, aos 3 dias de idade.....	66
<b>FIGURA 5.</b> Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM desafiados com SM, aos 3 dias de idade. ....	67
<b>FIGURA 6.</b> Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE frente a diferentes desafios, aos 7 dias de idade.....	69
<b>FIGURA 7.</b> Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE+ SM frente a diferentes desafios, aos 7 dias de idade.. ....	70
<b>FIGURA 8.</b> Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM não desafiados, aos 7 dias de idade.....	70
<b>FIGURA 9.</b> Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM desafiados com SE, aos 7 dias de idade.....	71
<b>FIGURA 10.</b> Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM desafiados com SM, aos 7 dias de idade. ....	71

## RESUMO

Dentre as doenças transmitidas por alimentos, a salmonelose é a que mais preocupa os consumidores e produtores de aves, pois na maioria dos casos de toxinfecção por este agente, carne de aves ou derivados estão envolvidos. Devido ao impacto na saúde pública, se faz necessário a busca de ferramentas de controle efetivas deste patógeno na produção de aves. Ao longo dos últimos anos, percebe-se que, sempre quando se estabelece controle para um sorovar, ocorre alternância de prevalência para outro sorovar da mesma espécie. Esse comportamento, aliado a enorme quantidade de sorovares conhecidos, levam a crer que o sucesso no controle desse agente está associado a diversas ações, dentre elas, o uso de vacinas. Para entender melhor o uso de vacinas no controle de *Salmonella*, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos: Capítulo I que apresenta uma revisão bibliográfica sobre “Vacinas como Alternativa de Controle à *Salmonella*” e no Capítulo II que descreve um experimento científico sobre o “Vacinação com Bacterina de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Minnesota em Matrizes de Frangos de Corte: Controle da Colonização e Resposta Imune na Progênie Desafiada”, onde foi observado, em frangos de 1 dia, que o grupo oriundo de reprodutoras vacinadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Minnesota (SM) apresentaram maior quantidade de células CD4+ no íleo e CD8+ no ceco. Aos sete dias após o desafio, a progênie destas reprodutoras também apresentaram menor colonização no fígado que frangos oriundos de reprodutoras vacinadas com SE, porém não houve diferença para a colonização do ceco, papo e fígado aos três, 14 e 21 dias após desafio.

**Palavras-Chave:** vacinas inativadas; resposta imune; *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Minnesota.

## **ABSTRACT**

Among several foodborne illnesses, salmonellosis is the main concern to consumers and producers of broilers, because in most cases of food-poisoning by this agent poultry meat or derivatives are involved. Due to the impact on public health, the search for effective tools to control this pathogen in poultry production is needed. Over the past few years, it is noticed that, when the control for a serovar is established, replacement to another serovar of the same species occurs. This behavior, coupled with the huge amount of known serovars, suggests that success in controlling this agent is associated with several actions, such as vaccine. To a better understanding about the use of vaccines in controlling *Salmonella*, this study was divided into two chapters: Chapter I which presents a literature review of "Vaccines as an Alternative to Control *Salmonella*" and Chapter II describes a scientific research about " Vaccination with Bacterins of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Minnesota in broiler Breeders: Control of Intestinal Colonization and Immune Response in Challenged Progeny". It was observed, in day-old-chick, that the group descendant of vaccinated breeders with SE and SM showed higher amount of CD4+ cells in the ileum and CD8 + in the cecum, at 7 days after challenge. The progeny from these breeders also had lower colonization in the liver than birds from breeders vaccinated with SE, but no difference in colonization of cecum, crop and liver at three, 14 and 21 days after challenge was found.

**Keywords:** inactivated vaccines; immune response; *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Minnesota.

## INTRODUÇÃO GERAL

A avicultura industrial, do modo que conhecemos hoje, é fruto da evolução de fatores como genética, nutrição, manejo e sanidade. A soma desses fatores fez com que a avicultura tivesse uma rápida expansão em todo território nacional, tornando o Brasil um importante produtor mundial de carne de frango (Belusso e Hespanhol, 2010).

À medida que as técnicas de manejo evoluíram e possibilitaram o aumento da densidade dentro dos aviários, com melhor retorno financeiro para os criadores, também facilitou a disseminação de agentes patogênicos dentro do ambiente de criação. Destaque para as salmonelas, que, acompanham a avicultura industrial desde o início de sua expansão, e hoje são objeto de barreiras sanitárias/comerciais devido ao risco relacionado à toxinfecção em seres humanos. Por isso, a manutenção de uma cadeia de produção de frangos de corte livres desse agente é obrigatório para o sucesso de qualquer agroindústria (Cogan e Humphrey, 2003).

Dentre os sorovares conhecidos por causarem doenças sistêmicas em seres humanos (Newell et al., 2010), a *Salmonella* Enteritidis (SE) ainda é o sorotipo mais comumente encontrado nos casos de doenças transmitidas por alimentos (CDC, 2011).

*Salmonella* Enteritidis ocupou seu lugar na avicultura a partir do momento que os órgãos governamentais de diversos países passaram a adotar rígidas estratégias de combate visando à erradicação, em particular, de dois sorotipos específicos das aves, *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum. O combate acirrado a esses dois sorotipos provavelmente deixou um nicho que foi ocupado pela SE (Rabsch et al., 2000). A SE não causa doença clínica nas

aves (Guard-Petter, 2001), portanto, sua presença nos lotes de reprodutoras ou frangos de corte, causa pouca ou nenhuma perda econômica, talvez por esse fato, não houve interesse imediato no combate a esse agente.

Levantamento realizado com dados do Instituto Adolfo Lutz (Taunay et al., 1996) mostrou que 0,37% de 28.658 amostras humanas e 0,85% de 14.345 amostras não humanas, pesquisadas no período entre 1950 e 1990, foram positivas para SE. Depois do primeiro relato da ocorrência de SE em aves no Brasil, em 1990 (Ferreira et al., 1990), as quantidades de amostras positivas para SE aumentaram significativamente. Estudo conduzido por Tavechio et al. (1996) com dados do mesmo laboratório, no período de 1991 a 1995, mostrou que o percentual de amostras positivas para SE em amostras humanas passou para 64,9% de 2.254 amostras e para 40,7% das 3.236 amostras de fontes não humanas, com grande destaque para materiais ligados à avicultura (aves, amostras ambientais, ovos, etc.).

Freitas (2011), com isolados somente de frangos de corte, mostrou que o sorovar predominante ainda é SE, porém com grande destaque para *Salmonella* Minnesota (SM) que passou a ocupar o segundo lugar com 9,38% das 416 amostras pesquisadas no período de 2009 a 2010.

A oscilação de prevalência dos sorovares de *Salmonella* nas últimas décadas (Lahellec e Colin, 1985; Trepka et al., 1999; Roy et al.; 2001; Foley et al., 2008; Foley et al., 2011) mostra que, sempre que estratégias de controle são adotadas visando um sorovar específico, outro começa a ser isolado com mais frequência. Por isso, várias medidas de controle são necessárias para combater a presença deste microrganismo, tanto nas aves, quanto no ambiente que as cercam. Neste contexto podemos citar aquisição de material genético

livre, utilização de acidificantes, produtos de exclusão competitiva, antibioticoterapia e um programa de biossegurança moldado para atender às necessidades de cada segmento da cadeia produtiva, o qual, dentre inúmeras outras medidas de controle, contempla a utilização de vacinas.

No Brasil, o uso de vacinas inativadas contra SE em aves reprodutoras pesadas está liberado desde 2003 (BRASIL, 2003). A mesma legislação possibilita o uso de vacinas autógenas inativadas para outros sorovares. Assim, elaboramos o presente estudo com o objetivo de revisar os mecanismos de evasão celular da *Salmonella*, sua persistência dentro das células dos hospedeiros e também a interação do patógeno com o sistema imune das aves, bem como as vacinas disponíveis para seu controle. E, em um segundo momento, comparar, por meio de um trabalho científico, a resistência à infecção precoce e a dinâmica celular na mucosa intestinal, em progênies de reprodutoras que receberam um programa de vacinação utilizando uma associação de vacinas inativadas contra SE e SM, frente a progênies de reprodutoras que receberam um programa usando somente vacina inativada contra SE.

Os capítulos foram elaborados nas normas para publicação na revista *Archives of Veterinary Science*, da Universidade Federal do Paraná. Ver anexo 1.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A Evolução Da Avicultura Industrial Brasileira E Seus Efeitos Territoriais. **Revista Percursos**, v. 2, n. 1, p. 25-51, 2010.

BRASIL. Instrução Normativa 78. 2003.

CDC. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food. **Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996--2010**, 2011.

COGAN, T. A.; HUMPHREY, T. J. The rise and fall of Salmonella Enteritidis in the UK. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 114-119, 2003.

FERREIRA, A.; ITO, N.; BENEZ, S. Infecção natural e experimental por Salmonella enteritidis em pintos. Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1990. p.171.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. **J Anim Sci**, v. 86, n. 14 Suppl, p. E149-62, Apr 2008.

FOLEY, S. L.; NAYAK, R.; HANNING, I. B.; JOHNSON, T. J.; HAN, J.; RICKE, S. C. Population dynamics of Salmonella enterica serotypes in commercial egg and poultry production. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 13, p. 4273-9, Jul 2011.

FREITAS, J. B. Epidemiologic trends of the prevalence serovars in poultry production chain and database strains model applied in Brazil. **INTERNATIONAL SEMINAR ON AVIAN SALMONELLOSIS UBABEF**, 2011.

GUARD-PETTER, J. The chicken, the egg and Salmonella enteritidis. **Environ Microbiol**, v. 3, n. 7, p. 421-30, Jul 2001.

LAHELLEC, C.; COLIN, P. Relationship between serotypes of Salmonellae from hatcheries and rearing farms and those from processed poultry carcasses. **Br Poult Sci**, v. 26, n. 2, p. 179-86, Apr 1985.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; DER GIESSEN, J. V.; KRUSE, H. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, Supplement, n. 0, p. S3-S15, 5/30/ 2010.

RABSCH, W.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M.; KINGSLEY, R. A.; HINZ, K. H.; TSCHAPE, H.; BAUMLER, A. J. Competitive exclusion of Salmonella enteritidis by Salmonella gallinarum in poultry. **Emerg Infect Dis**, v. 6, n. 5, p. 443-8, Sep-Oct 2000.

ROY, P.; DHILLON, A. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; SCHABERG, D. M.; BANDLI, D.; JOHNSON, S. Pathogenicity of different serogroups of avian salmonellae in specific-pathogen-free chickens. **Avian Dis**, v. 45, n. 4, p. 922-37, Oct-Dec 2001.

TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. The role of Public Health Laboratory in the problem os

salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 119-127, 1996.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M.; IRINO, K. Changing patterns of Salmonella serovars: increase of Salmonella enteritidis in Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 38, n. 5, p. 315-22, Sep-Oct 1996.

TREPKA, M. J.; ARCHER, J. R.; ALTEKRUSE, S. F.; PROCTOR, M. E.; DAVIS, J. P. An increase in sporadic and outbreak-associated Salmonella enteritidis infections in Wisconsin: the role of eggs. **J Infect Dis**, v. 180, n. 4, p. 1214-9, Oct 1999.

## CAPÍTULO 1

# VACINAS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE À SALMONELLA

## VACINAS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE À SALMONELLA

(Vaccines as Alternative Control to *Salmonella*)

### RESUMO

Dentre as doenças transmitidas por alimentos, as salmoneloses ocupam um lugar de destaque ao redor do mundo. *Salmonella* é um patógeno que tem habilidade de infectar diferentes tipos de células e pode se multiplicar no interior de células imunes. O sucesso da habilidade da *Salmonella* em colonizar diferentes hospedeiros e ultrapassar as barreiras de defesa está ligado a complexos e sofisticados mecanismos, que possibilitam a infecção e a persistência dentro das células dos hospedeiros. O uso indiscriminado de antibiótico em aves levou ao aparecimento de cepas resistentes a diversas moléculas deste medicamento. Nesse cenário, cada vez mais, busca-se utilizar o sistema imunológico das aves como ferramenta de controle a esse patógeno. A presente revisão tem o objetivo de abordar os principais mecanismos de infecção e interação do patógeno com o sistema imunológico das aves, bem como as vacinas disponíveis atualmente para seu controle.

**Palavras-Chave:** Frangos de corte; infecção por *Salmonella*, vacinas vivas e inativadas.

**ABSTRACT**

Among foodborne illnesses, salmonellosis have an important place throughout the world. *Salmonella* is a pathogen that has the ability to infect different cell types and multiply within immune cells. The success of the ability of *Salmonella* to colonize different hosts and overcome the barriers of defense is linked to complex and sophisticated mechanisms that enable infection and persistence within the host cells. The indiscriminate use of antibiotic molecules led to the emergence of resistant strains. In this scenery, it is important to understand how to use the bird immune system as a pathogen control tool. The present review aims to address the main mechanisms of infection and pathogen interaction with the immune system of birds, as well as the currently available vaccines for their control.

**Keywords:** broilers chicken; *Salmonella* infection, live and inactivated vaccines.

## INTRODUÇÃO

*Salmonella* é uma bactéria que afeta os animais e seres humanos, sendo que aves e seus produtos são particularmente envolvidos em caso de toxinfecção em seres humanos. A espécie *Salmonella* entérica enterica possui mais de 2000 sorotipos descritos, e a prevalência pode variar entre localidades, estados e países, sendo recomendado estabelecer medidas de vigilância e identificação dos sorotipos de *Salmonella* em seres humanos e aves de produção, com o propósito de desenvolver programas de controle específicos (OIE, 2011).

Pesquisa publicada pela Food Borne Diseases Active Surveillance Network (CDC, 2011) comparou o número de casos de doenças por contaminação alimentar em seres humanos nos Estados Unidos e demonstrou que as infecções causadas por *Salmonella* corresponderam a 43,25% dos casos confirmados em laboratório e também foram maiores em números de internações (2.290 casos) e mortes (29 casos).

No Brasil, ao longo dos últimos anos (Taunay et al., 1996; Tavechio et al., 1996; Freitas, 2011), também vem sendo observada uma alternância entre a prevalência dos diversos sorovares de *Salmonella*. Dentre eles, a *Salmonella* Enteritidis (SE) ainda é o sorotipo mais comumente isolado em frangos de corte e reprodutoras (Kanashiro et al., 2005). Porém, outros sorovares como a *Salmonella* Minnesota (SM) vêm ocupando lugar de destaque nesse cenário. Dados apresentados por Freitas (2011) mostraram que os isolados de SM aumentaram de 0,96% no período de 2004/2008, para 9,38% no período de 2009/2010, passando da décima posição para a segunda, atrás apenas do sorovar Enteritidis com 9,86% dos isolados.

A principal forma de controle de *Salmonella* em produção avícola relaciona-se a medidas de biosseguridade. Associadas a isso, várias ferramentas também têm sido empregadas como uso de antibióticos, ácidos orgânicos de cadeia curta na água ou ração, prébióticos, probióticos e vacinação (Van Immerseel et al., 2005; Pickler et al., 2012).

Em especial o uso de antibióticos para controle de salmoneloses em aves demonstrou-se pouco eficiente e ainda, provocou o aparecimento de estirpes resistentes a diversas moléculas utilizadas (Ribeiro et al., 2008). Ácidos orgânicos têm demonstrado serem eficazes no controle de SE em aves, entretanto, recentemente Pickler et al. (2012) compararam a eficiência do uso de ácidos orgânicos em frangos de corte, inoculados experimentalmente com SE e SM, e concluíram que o uso de ácidos orgânicos reduziu a excreção de SE no papo e ceco de frangos de corte, porém, foram pouco efetivos no grupo desafiado com SM. Esta observação levantou a hipótese de que esses diferentes produtos utilizados para o controle de *Salmonella* podem ter eficácias diferentes dependendo do sorovar estudado.

Nesse cenário, o uso de vacinas vem sendo visto como uma boa estratégia no controle das salmoneloses (Zhang-Barber et al., 1999; Mastroeni et al., 2001; Penha Filho et al., 2009). No Brasil, o uso de vacinas inativadas contra SE em reprodutoras pesadas foi aprovado somente em 2003 (BRASIL, 2003). O uso de vacinas inativadas induz a uma elevada produção de anticorpos (Liu et al., 2001), os quais são transmitidos às progênes via gema do ovo (Kovacs-Nolan e Mine, 2012). Esses anticorpos, segundo Friedman, (2003), são de fundamental importância no controle da transmissão/disseminação da *Salmonella* ao longo da cadeia de produção avícola. O uso

dessas bacterinas contra SE já foi exaustivamente estudado (Miyamoto et al., 1999; Liu et al., 2001; Inoue et al., 2008; Penha Filho et al., 2012) e sua eficiência já foi colocada à prova em inúmeros estudos, porém o uso de vacinas inativadas contra outros sorovares e a possível proteção cruzada entre a resposta para estes diferentes sorovares de *Salmonella* é um campo a ser estudado.

O objetivo da presente revisão é abordar os mecanismos imunológicos de resposta do hospedeiro à *Salmonella* e os diferentes tipos de vacinações existentes contra a salmonelose em aves.

## **MECANISMOS IMUNOLÓGICOS RELACIONADOS À PERSISTÊNCIA E EXCREÇÃO DE *SALMONELLA***

*Salmonella entérica* pode permanecer cronicamente viável nas células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) por até um ano após primeiro contato do hospedeiro com o agente, e é comum encontrar esse agente no interior dos macrófagos (Monack et al., 2004).

Alguns outros sorovares com hospedeiro específico como *Salmonella* Typhi, Dublin, e Pullorum podem, depois da doença clínica ou infecção assintomática, persistir no organismo por longos períodos de tempo. No caso das *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Dublin, a excreção bacteriana durante longos períodos de tempo é associada à proliferação do agente patógeno na vesícula biliar (Paulin et al., 2002; Paulin et al., 2007).

É proposto que a *Salmonella entérica* resida nos linfonodos mesentéricos dos mamíferos portadores, incluindo o de seres humano, os quais disseminam as bactérias via fezes. Algumas condições que promovem imunossupressão permitem a disseminação para o fígado, vesícula biliar, e intestino, promovendo novamente a excreção bacteriana nas fezes, assim como na fase inicial da infecção (Monack et al., 2004).

No caso particular das aves que não possuem linfonodos mesentéricos, a persistência da *Salmonella* é no sistema reticuloendotelial (Zhang-Barber et al., 1999). Após infecção oral por *Salmonella Gallinarum*, por exemplo, esta coloniza o tecido linfoide associado ao intestino (GALT) no trato gastrintestinal, e, a partir daí, é levada até o fígado e baço pelos macrófagos, persistindo assim nestes órgãos (Jones et al., 2001).

A microbiota normal do hospedeiro apresenta um papel de competição com *Salmonella*. Em infecções por *Salmonella Typhimurium*, observa-se que o processo inflamatório modifica o balanço entre a microbiota intestinal em favor do patógeno. Em um intestino sadio existem interações benéficas entre a microbiota normal e a mucosa intestinal. A resposta inflamatória dos hospedeiros neste caso, gerada especificamente pelos fatores de virulência da *Salmonella Typhimurium*, alteram as condições no lúmen intestinal e ativam a competição em favor do patógeno (Stecher et al., 2007).

O processo inflamatório ocasiona aumento da secreção de peptídeos antibacterianos, lecitinas, mucinas, infiltração e migração de células fagocíticas, deixando radicais livres de oxigênio e nitrogênio (Dann e Eckmann, 2007). Os fatores antibacterianos podem interferir no crescimento da microbiota normal

reduzindo sua capacidade de competir com a *Salmonella* Typhimurium (Suzuki et al., 2004). As espécies bacterianas da microbiota podem ser mais sensíveis a estes fatores antibacterianos do que a *Salmonella*, sob estas condições, a microbiota simplesmente se desenvolve mais lentamente, permitindo que o patógeno aproveite-se dessas condições e multiplique-se exponencialmente (Stecher et al., 2007).

Recentemente, Winter et al. (2010) observou que derivados reativos do oxigênio, gerados durante o processo inflamatório, reagem com componentes sulfurados luminais (tiosulfato) para formar um novo receptor de elétrons, o tetrionato. Os genes que conferem a capacidade de utilizar o tetrionato como receptor de elétrons fazem com que a *Salmonella* Typhimurium cresça com vantagem sobre a microbiota normal do lúmen intestinal inflamado, ou seja, os fatores de virulência desta bactéria induzem a produção desse receptor de elétrons no hospedeiro, permitindo ao patógeno utilizar a respiração (ciclo respiratório oxidativo) para competir com os microrganismos da flora intestinal. Portanto, a capacidade de desencadear a inflamação intestinal é crucial para a instalação deste patógeno.

Há muito se estuda as mutações no código genético da *Salmonella* (Stuttard, 1973). Dentro das amplas mutações no genoma do sorovar Typhimurium foram identificados grupos de genes envolvidos na colonização intestinal nos bovinos (Paulin et al., 2002), frangos de corte (Morgan et al., 2004) e suínos (Carnell et al., 2007), que revelaram que o gênero *Salmonella*, tanto nos hospedeiros específicos como em não específicos, precisa de fatores de colonização.

Os sorovares hospedeiro-específicos persistem mais nos linfonodos mesentéricos, no caso de mamíferos, e são determinantes para sua virulência sistêmica (Paulin et al., 2002).

Exemplo disso são alguns estudos experimentais que mostraram o comportamento diferencial entre sorovares hospedeiro-específicos e não específicos. Na mucosa do íleo e cólon de suínos inoculados oralmente com cepas de *Salmonella* Typhimurium e de *Salmonella* Cholerasuis, observou-se que as contagens do sorovar Typhimurium foram significativamente maiores às 36 e 48 horas pós inoculação (PI) em comparação com o sorovar Cholerasuis. Por outro lado, uma elevada contagem do sorovar Cholerasuis foi recuperado de linfonodos mesentéricos, tanto do íleo como do cólon. Por conseguinte, a virulência entérica do sorovar Typhimurium é associada com a rápida multiplicação na mucosa intestinal enquanto a virulência sistêmica do sorovar Cholerasuis associa-se com a persistência em linfonodos mesentéricos (Paulin et al., 2007).

Outra observação foi uma diferença significativa entre estas duas cepas na excreção fecal, onde animais inoculados com sorovar Typhimurium apresentaram maior excreção que os desafiados com Cholerasuis. As diferenças também podem ser constatadas na resposta de citocinas, onde às 24 horas pós inoculação, o sorovar Typhimurium provocou altos níveis de transcrição de TNF, IL-8 e IL-18 comparado com o sorovar Cholerasuis, de tal maneira que estes elevados níveis de citocinas pro-inflamatórias podem afetar à microbiota normal do intestino e promover a persistência intestinal da bactéria patogênica (Paulin et al., 2007).

Pode-se então concluir que a rápida multiplicação do sorovar Typhimurium poderia desencadear uma primeira resposta inflamatória seguida de uma infecção de grande magnitude, o que confinaria localmente o processo à mucosa intestinal, enquanto que a lenta multiplicação do sorovar Cholerasuis lhe permitiria evadir a ativação da resposta imune inata, favorecendo sua disseminação dissimulada (Uthe et al., 2007).

Além disso, o sorovar Typhimurium possui genes que usam o TTSS (Type 3 Secretion System), codificados pelas Ilhas de Patogenicidade 1 e 2 (SPI-1 e SPI-2). TTSS é um complexo protéico que estimula o rearranjo da actina no citoesqueleto celular, o qual facilita a invasão bacteriana e também contribui com sua multiplicação nas células epiteliais (Steele-Mortimer et al., 2002).

No caso específico das aves tem sido observado que a *Salmonella Gallinarum* precisa absolutamente do TTSS codificado pela SPI2 para causar a infecção e possibilitar a sobrevivência dentro dos macrófagos e multiplicação no sistema reticuloendotelial. Aliás, a SPI-2 pode estar relacionada com a translocação desde o intestino até o fígado e o baço, sugerindo um mecanismo que envolve sobrevivência e transporte no interior de fagócitos (Jones et al., 2001).

Existem outros mecanismos que favorecem a persistência desse microrganismo no hospedeiro. Alguns trabalhos citam a expressão do gene ShdA como fator essencial para uma prolongada excreção de *Salmonella Typhimurium* via fezes (Kingsley et al., 2002; Kingsley et al., 2003). Dorsey et al. (2005) descreveram a importância de uma proteína codificada pelo gene

MisL, que estaria associada a colonização intestinal crônica em modelos de camundongos e aves. Weening et al. (2005) em modelos estudados em camundongos, levantaram a possibilidade de que as fímbrias processadas pelos genes *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc* e *std* estariam envolvidas no processo de colonização intestinal por *Salmonella* Typhimurium.

Outro fator importante a ser considerado é a susceptibilidade das espécies. Esperam-se diferenças substanciais na expressão de genes receptores em animais de espécies diferentes em comparação com os hospedeiros específicos. Por exemplo, a fimbria tipo 1 não contribui para a persistência intestinal no rato, mas é muito importante na infecção de porcos (Kingsley et al., 2003).

## **RESPOSTAS IMUNES ÀS INFECÇÕES POR *SALMONELLA* EM AVES**

O sistema imune é uma barreira de proteção natural contra infecções de qualquer tipo e o mesmo pode ser estimulado para produzir respostas específicas através da utilização de ferramentas como as vacinas (Eckmann e Kagnoff, 2001; Raupach e Kaufmann, 2001).

Em aves pode-se observar diferentes respostas imunes frente às infecções por *Salmonella*, principalmente quando comparamos infecções por salmonelas hospedeiro específicas com não específicas. Infecções por *Salmonella* Typhimurium, por exemplo, resultam em uma significativa inflamação da mucosa intestinal (Henderson et al., 1999), e o mesmo pode ser aplicado a outros sorovares. Setta et al. (2009) demonstraram significativa

expressão de marcadores de citocinas pró-inflamatórias no intestino de aves infectadas com *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis em comparação às infecções por *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum. Kaiser et al. (2000), também estudando infecções por salmonelas hospedeiro específicas, descreveram que as infecções causadas por esses sorovares, causam somente leve inflamação no intestino.

Em modelos de epitélio intestinal de galinhas, Kaiser et al. (2000) mostrou que após o desafio por *Salmonella* Typhimurium existe um forte aumento nos níveis da citocinas IL-6, enquanto que, após o desafio por *Salmonella* Gallinarum, praticamente não houve alteração comparando com células não desafiadas. Iqbal et al. (2005), usando uma cepa mutante de *Salmonella* Typhimurium, sem flagelos e sem a ilha de patogenicidade 1 (SPI-1), mostrou redução na produção de IL-1B e IL-6, evidenciando assim que tanto a presença dos flagelos quanto das ilhas de patogenicidade estão envolvidos no processo inflamatório.

Aliás, a ausência dos flagelos, tanto na *Salmonella* Gallinarum quanto na Pullorum é um dos principais fatores de sucesso desses sorovares em causar doença sistêmica em aves, já que sem os flagelos as bactérias não são reconhecidas pelos Receptores Tipo Toll – 5 (TLR5), que são responsáveis pela detecção da flagelina, enquanto essa ainda está localizada fora das células e, assim não induzem a produção de citocinas inflamatórias (Miao et al., 2007).

Em geral, a imunidade de mucosa do intestino é a primeira linha de defesa contra *Salmonella*. É basicamente composta por imunoglobulinas (IgA -

secretória) e o MALT (Tecido Linfóide Associado à Mucosa). Depois de ultrapassada a primeira linha de defesa, a *Salmonella* desencadeia uma resposta imune sistêmica, onde, tanto os mecanismos de imunidade humoral quanto os mediados por células são ativados e desempenham papéis importantes contra infecções por esse agente (Berndt et al., 2007).

### **Imunidade Humoral**

Uma vez que um animal é infectado com *Salmonella*, uma rápida resposta imune humoral é desencadeada. Esta resposta pode ser afetada por muitos fatores, incluindo a intensidade do desafio (Hassan et al., 1993), a virulência do organismo (Hassan e Curtiss, 1994b), a via de administração e a idade do animal (Hassan e Curtiss, 1994a). Após uma semana do contato com a *Salmonella* já é possível detectar anticorpos no soro das aves (Gast e Beard, 1990; Hassan et al., 1991) e esta resposta pode persistir por 10 semanas ou mais. Usando ensaios imunoenzimáticos (ELISA), Hassan et al. (1991) descreveram que a primeira imunoglobulina a ser produzida é a IgM, seguida de IgG e IgA. Os níveis de IgM e IgA diminuem gradualmente, enquanto os níveis de IgG podem persistir por períodos superiores a 40 semanas (Bailey et al., 2007).

Imunoglobulinas séricas podem ser passadas verticalmente para a progênie através da gema de ovo e podem inibir o crescimento da *Salmonella* no organismo destes indivíduos até mesmo durante o período de incubação (Gast et al., 1997). Existe uma série de componentes antigênicos na superfície ou no interior da *Salmonella*, muitos dos quais serão reconhecidos como

estranhos pelo hospedeiro (Timms et al., 1994; Liu et al., 2001). A intensidade de produção de anticorpos antigênicos individuais pode variar durante o curso da resposta imune. Ochoa-Reparaz et al. (2004) descreveu que, primeiramente ocorre a produção de anticorpos contra antígenos imunodominantes, ficando para um segundo momento, a produção de anticorpos para os demais antígenos. Baay e Huis in 'T Veld (1993) observaram que a produção de anticorpos antíflageles foram maiores no início da infecção enquanto soros anti-LPS predominaram em fases posteriores em frangos desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Esses mesmos anticorpos foram pouco produzidos em aves jovens em comparativo com aves mais velhas. Nas aves jovens, a produção de anticorpos de resposta aos antígenos fimbriais SEF14 foram consideráveis, enquanto foram considerados apenas “modestos” em aves adultas (Thorns et al., 1996).

Foi demonstrado (Kaiser e Lamont, 2001; Kaiser et al., 2002) uma correlação fortemente positiva entre a produção de anticorpos e a redução da colonização por *Salmonella*, confirmando a importância do monitoramento desses anticorpos após o uso de vacinas inativadas. Por outro lado, Beal et al. (2006), demonstraram, removendo cirurgicamente a Bolsa Cloacal de embriões de aves com 17 dias de incubação e posteriormente desafiando as aves com 6 semanas de idade com *Salmonella* Typhimurium, que o tempo de remoção do agente no intestino foi o mesmo do grupo não bursectomizado, demonstrando que a imunidade humoral não é suficiente para a eliminação desse microrganismo em desafios contra esse sorovar.

A especificidade da resposta humoral também difere para infecções por diferentes sorovares de *Salmonella*. Respostas humorais em indivíduos

infectados com diferentes sorovares geraram marcadores sorológicos que demonstraram proteção cruzada para os antígenos LPS dos grupos B e D (Nicholas e Cullen, 1991; Barrow, 1992; Barrow et al., 1992).

### **Imunidade Celular**

Parece amplamente aceito que a imunidade mediada por células é mais importante do que as respostas humorais na proteção contra a *Salmonella* (Mastroeni et al., 1993).

Beal et al. (2004) demonstraram uma correlação significativa entre os níveis de interferon-gama e o tempo da eliminação do agente em uma infecção experimental por *Salmonella* Typhimurium em aves com seis semanas de idade. Berndt e Methner (2001), comparando infecções com cepas virulentas e atenuadas de *Salmonella* Typhimurium em pintinhos de 1 dia, observaram que as células envolvidas na resposta imune (Linfócitos T CD8+), tanto do grupo desafiado com cepa virulenta quanto do grupo que recebeu a cepa vacinal, eram as mesmas, diferenciando apenas nas quantidades.

Farnell et al. (2001), administrando interferon-gama intraperitoneal em pintos Leghorn de um dia de idade e desafiando os mesmos oralmente com *Salmonella* Enteritidis, observou redução na colonização dos órgãos em relação aos grupos controle.

Van Immerseel et al. (2002) descreveram com detalhes a dinâmica da invasão da parede do ceco de pintos de 1 dia desafiados oralmente com *Salmonella* Enteritidis e observaram, através de imunoistoquímica, que 24

horas após o desafio havia presença de macrófagos e células T na mucosa do ceco, enquanto que os linfócitos B vieram a aparecer somente dois dias após o desafio.

### **Imunidade Passiva**

A imunidade passiva, descrita como os anticorpos produzidos pela mãe e passado a progênie, é uma ferramenta bastante utilizada na avicultura para o controle de doenças. Os anticorpos maternos são muito úteis, por exemplo, no combate a doença de Gumboro (Fussell, 1998).

Methner e Steinbach (1997) avaliaram a transmissão de anticorpos contra *Salmonella* e seus efeitos protetivos em progênies oriundas de matrizes vacinadas com vacina inativada contra *Salmonella* Enteritidis. A vacinação resultou em aumento na concentração de anticorpos na gema de ovos incubáveis, no soro e jejuno das progênies até aos 21 dias de idade e ainda altos títulos de IgG e IgA no soro das aves neste mesmo período. Ainda, compararam a eficiência da proteção desses anticorpos contra desafio com *Salmonella* Enteritidis e verificaram que contagens de *Salmonella* entre 7 e 21 dias de idade, no ceco das progênies de matrizes vacinadas, foi menor do que no grupo de aves oriundas de reprodutoras não vacinadas.

De forma semelhante, Inoue et al. (2008) comprovou a eficiência dos anticorpos maternos em um experimento comparando progênies oriundas de matrizes vacinadas com vacina inativada contra *Salmonella* Enteritidis com progênies de lotes não vacinados. Aves dos dois grupos foram desafiadas no

1º e no 14º dia de vida. Nos dois desafios, os isolamentos de *Salmonella* nos grupos oriundos de matrizes vacinadas foram menores do que aqueles de lotes não vacinados, ainda que, o tempo de eliminação de *Salmonella* nas fezes tenha sido muito semelhante nos dois grupos quando esses foram desafiados com um dia de vida. Também observou que progênies de matrizes vacinadas e não desafiadas apresentaram anticorpos detectáveis em ELISA até o 28º dia de idade.

Por outro lado, Young et al. (2007) estudou a eficiência do uso de vacinas inativadas contra *Salmonella* Hadar, Kentucky e Heidelberg e três doses de vacinas vivas contra *Salmonella* Typhimurium em reprodutoras sobre a proteção das progênies contra a respectiva cepa presente na vacina inativada e concluiu que não houve redução significativa no número de amostras positivas nos grupos de matrizes vacinados em relação ao grupo de matrizes não vacinadas.

## **VACINAS COMO ALTERNATIVAS AO CONTROLE DE SALMONELLA**

Devido à importância da *Salmonella* para saúde pública, rígidas estratégias de controle devem ser introduzidas pelas agroindústrias no intuito de controlar a presença de *Salmonella* spp. na população animal de sua integração. As principais medidas de controle no combate à *Salmonella* estão ligadas à biossegurança. Dentre essas medidas, pode se citar o controle da entrada de material genético, ração, água, limpeza e desinfecção dos aviários, controle de pragas e destinação correta dos resíduos (Foley et al., 2008).

Nos últimos tempos, nota-se um interesse maior pelo uso da vacinação como forma adicional de controle da *Salmonella*, especialmente para os sorovares de importância em saúde pública (Desin et al., 2013).

Mundialmente, não existe um consenso sobre o uso de vacinas contra *Salmonella*. Na Europa, por exemplo, alguns países como a Dinamarca, Finlândia e Suécia proíbem o uso de vacinas (Wegener et al., 2003; Keery, 2010). Já na Inglaterra (EU, 2003), a vacinação de lotes de postura comercial contra *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium é obrigatória. Apesar de várias vacinas serem desenvolvidas de forma experimental, somente algumas são autorizadas para uso comercial, pois as cepas usadas para essa finalidade precisam atender algumas características para que possam ser diferenciadas das cepas de campo (conceito DIVA – Differentiating Infected from Vaccinated Animals), ser suficientemente imunogênicas e ainda serem eliminadas do organismo da ave antes do abate (Barrow, 2007).

Do ponto de vista imunológico, uma boa vacina contra *Salmonella* deveria conferir imunidade contra vários sorovares. Como os principais sorovares relacionados às toxinfecções alimentares em humanos são a *Salmonella* Enteritidis e a Typhimurium, a maioria das vacinas, vivas ou inativadas, desenvolvidas até hoje, são para combater esses sorovares. Estudos com uma vacina comercial contra *Salmonella* Gallinarum demonstraram que essa tem se mostrado eficiente na proteção contra a *Salmonella* Enteritidis (Barrow, 1991; Feberwee et al., 2001) por serem sorovares pertencentes ao mesmo grupo.

Parker et al. (2001) não encontraram diferença significativa em ovos ou infecção do trato reprodutivo de aves de postura vacinadas com uma cepa mutante (Aro A) de *Salmonella* Typhimurium, com 1 dia, 4 e 22 semanas de idade, e desafiadas com *Salmonella* Enteritidis com 30 semanas de idade.

Curtiss e Hassan (1996), usando aves SPF (Specific Pathogen Free), vacinadas com uma cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium (x3985) e, posteriormente, desafiadas com diferentes sorovares e grupos de *Salmonella*, observaram que duas doses da vacina evitaram a colonização de órgãos para os grupos B, D e E e reduziram significativamente a colonização intestinal para o grupo C. Entretanto, a proteção cruzada foi menos evidente para antígenos flagelares, embora algum grau dessa proteção possa ocorrer (Thorns et al., 1996).

### **Vacinas Vivas Atenuadas**

A disponibilidade do genoma completo da *Salmonella* Typhimurium (McClelland et al., 2001) fez com que diversos avanços fossem feitos na pesquisa de cepas mutantes de campo capazes de atender os requisitos para serem usados como cepas vacinais, principalmente, a identificação dos genes que expressam a virulência da bactéria.

As vacinas vivas possuem uma série de vantagens que vão desde a aplicação até o tipo de resposta imune induzida, já que são capazes de estimular tanto a resposta imunológica celular citotóxica, com a presença de linfócitos T CD8+, e uma resposta humoral, essa última, além da produzir

outros anticorpos, produz também a IgA secretória, importante componente da imunidade da mucosa intestinal (Lillehoj et al., 2000; Van Immerseel et al., 2005; Penha Filho et al., 2012).

Vários trabalhos tem descrito com sucesso o uso cepas mutantes que não possuem alguns genes essenciais para o metabolismo, virulência e sobrevivência da *Salmonella* no organismo do hospedeiro (Cerquetti e Gherardi, 2000; Dorea et al., 2010; Methner et al., 2011; Springer et al., 2011).

Gamazo (2007) chamou atenção para alguns riscos que podem estar associados à utilização de vacinas vivas, principalmente devido a possibilidade de alguma reversão da patogenicidade do agente. Porém, as vacinas aprovadas para uso comercial, precisam passar por rigorosos testes comprovando que para a cepa utilizada, o risco de reversão inexistente (EFSA, 2004).

### **Vacinas Inativadas**

São compostas por células bacterianas inativadas térmica ou quimicamente e que promovem uma boa produção de anticorpos. Da mesma forma que as vacinas vivas, existe um número muito grande de vacinas inativadas disponíveis no mercado (Desin et al., 2013). Porém, a difusão do uso dessas vacinas está restrita às vacinas inativadas contra *Salmonella* Enteritidis em matrizes reprodutoras e aves de postura comercial (Feberwee et al., 2001; Penha Filho et al., 2009). No Brasil, a legislação para uso dessas vacinas em reprodutoras pesadas está vigente desde 2003 (Brasil, 2003).

Diferente das vacinas vivas, a administração dessas vacinas induz uma forte produção de anticorpos, e esses, principalmente IgG, são transferidos para a progênie e persistem por algumas semanas, porém, para uma resposta satisfatória, são necessárias pelo menos duas aplicações, intramuscular ou subcutânea, o que torna seu uso, bastante oneroso devido a dificuldade de aplicação (Methner et al., 1994; Methner e Steinbach, 1997).

Devido aos mais de dois mil sorovares de *Salmonella* existentes, torna-se complexo encontrar uma vacina efetiva para todos e o uso de vacinas autógenas ainda foi pouco estudado (EFSA, 2004).

Além disso, vários autores (Springer et al., 2000; Clifton-Hadley et al., 2002; Woodward et al., 2002) têm demonstrado que a vacinação não resultará em uma proteção absoluta, pois o agente poderá colonizar o intestino das aves vacinadas. O benefício do uso da vacina está relacionado ao melhor preparo do hospedeiro para a uma rápida resposta imunológica e na agilidade da eliminação do agente (Barrow, 2007).

## CONCLUSÕES

Devido a enorme quantidade de sorovares existente, somada à habilidade da *Salmonella* em evadir-se da resposta imune das aves e, ainda, deste agente usar células envolvidas na resposta inflamatória para levá-la aos órgãos sistêmicos, faz com que o uso de vacinas seja realmente uma boa opção no combate a esse agente. Porém o desenvolvimento de uma vacina realmente efetiva é ainda uma missão bastante difícil.

Além da dificuldade do desenvolvimento de uma vacina realmente efetiva, existe o desafio do custo da tecnologia que não pode ser deixado de lado, já que as margens de lucro das agroindústrias não permitem fazer uso de tecnologias que aumentem seu custo de produção.

Vacinas vivas se mostram uma ferramenta mais vantajosa quando comparadas com vacinas inativadas, pela facilidade de aplicação e pelo tipo de resposta imune obtida, porém, não podemos deixar de ressaltar a importância do uso da vacina inativada contra *Salmonella* Enteritidis no Brasil, que ajudou na redução dos isolados desse agente tanto em produtos cárneos de frango quanto em ovos.

O uso de novas tecnologias mostra um futuro promissor no desenvolvimento de ferramentas efetivas no combate à *Salmonella*. Muito tem se falado hoje em dia em vacinas vetoriais, vacinas de DNA, e até mesmo o uso de adjuvantes que podem preparar o sistema imune para uma resposta mais rápida a esse agente.

As práticas de biosseguridade são a melhor forma de prevenir a entrada desse patógeno em nossos plantéis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAAY, M. F.; HUIS IN 'T VELD, J. H. Alternative antigens reduce cross-reactions in an ELISA for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry. **J Appl Bacteriol**, v. 74, n. 3, p. 243-7, Mar 1993.
- BARROW, P. A. Experimental infection of chickens with *Salmonella enteritidis*. **Avian Pathol**, v. 20, n. 1, p. 145-53, Mar 1991.
- BARROW, P. A. ELISAs and the serological analysis of *Salmonella* infections in poultry: a review. **Epidemiol Infect**, v. 109, n. 3, p. 361-9, Dec 1992.
- BARROW, P. A. *Salmonella* infections: immune and non-immune protection with vaccines. **Avian Pathol**, v. 36, n. 1, p. 1-13, Feb 2007.
- BARROW, P. A.; BERCHIERI, A., JR.; AL-HADDAD, O. Serological response of chickens to infection with *Salmonella gallinarum*-*S. pullorum* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Avian Dis**, v. 36, n. 2, p. 227-36, Apr-Jun 1992.
- BEAL, R. K.; POWERS, C.; DAVISON, T. F.; BARROW, P. A.; SMITH, A. L. Clearance of enteric *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens is independent of B-cell function. **Infect Immun**, v. 74, n. 2, p. 1442-4, Feb 2006.
- BEAL, R. K.; POWERS, C.; WIGLEY, P.; BARROW, P. A.; SMITH, A. L. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Avian Pathol**, v. 33, n. 1, p. 25-33, Feb 2004.
- BERNDT, A.; METHNER, U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 78, n. 2, p. 143-61, Jan 26 2001.
- BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infect Immun**, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, Dec 2007.
- BRASIL. Instrução Normativa 78. 2003.
- CARNELL, S. C.; BOWEN, A.; MORGAN, E.; MASKELL, D. J.; WALLIS, T. S.; STEVENS, M. P. Role in virulence and protective efficacy in pigs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium secreted components identified by signature-tagged mutagenesis. **Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 1940-1952, June 1, 2007.
- CDC. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food. **Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996--2010**, 2011.
- CERQUETTI, M. C.; GHERARDI, M. M. Vaccination of chickens with a temperature-sensitive mutant of *Salmonella enteritidis*. **Vaccine**, v. 18, n. 11-12, p. 1140-5, Jan 6 2000.
- CLIFTON-HADLEY, F. A.; BRESLIN, M.; VENABLES, L. M.; SPRIGINGS, K. A.; COOLES, S. W.; HOUGHTON, S.; WOODWARD, M. J. A laboratory study

of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. **Vet Microbiol**, v. 89, n. 2-3, p. 167-79, Oct 22 2002.

CURTISS, R., 3RD; HASSAN, J. O. Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines for poultry. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 54, n. 1-4, p. 365-72, Nov 1996.

DANN, S. M.; ECKMANN, L. Innate immune defenses in the intestinal tract. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, n. 2, p. 115-120 10.1097/MOG.0b013e32803cacf4, 2007.

DESIN, T. S.; KOSTER, W.; POTTER, A. A. *Salmonella* vaccines in poultry: past, present and future. **Expert Rev Vaccines**, v. 12, n. 1, p. 87-96, Jan 2013.

DOREA, F. C.; COLE, D. J.; HOFACRE, C.; ZAMPERINI, K.; MATHIS, D.; DOYLE, M. P.; LEE, M. D.; MAURER, J. J. Effect of *Salmonella* vaccination of breeder chickens on contamination of broiler chicken carcasses in integrated poultry operations. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 23, p. 7820-5, Dec 2010.

DORSEY, C. W.; LAARAKKER, M. C.; HUMPHRIES, A. D.; WEENING, E. H.; BAUMLER, A. J. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 1, p. 196-211, Jul 2005.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F. Cytokines in host defense against *Salmonella*. **Microbes Infect**, v. 3, n. 14-15, p. 1191-200, Nov-Dec 2001.

EFSA. **The use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry.** AUTHORITY, T. E. F. S.: The EFSA journal. 114: 1-74 p. 2004.

**EU. REGULATION (EC) No 2160/2003 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 17 November 2003 on the control of *Salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents.** OJL: 1-115 p. 2003.

FARNELL, M. B.; EL HALAWANI, M.; YOU, S.; MCELROY, A. P.; HARGIS, B. M.; CALDWELL, D. J. In vivo biologic effects of recombinant-turkey interferon-gamma in neonatal leghorn chicks: protection against *Salmonella enteritidis* organ invasion. **Avian Dis**, v. 45, n. 2, p. 473-8, Apr-Jun 2001.

FEBERWEE, A.; HARTMAN, E. G.; DE WIT, J. J.; DE VRIES, T. S. The spread of *Salmonella gallinarum* 9R vaccine strain under field conditions. **Avian Dis**, v. 45, n. 4, p. 1024-9, Oct-Dec 2001.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. **J Anim Sci**, v. 86, n. 14 Suppl, p. E149-62, Apr 2008.

FREITAS, J. B. Epidemiologic trends of the prevalence serovars in poultry production chain and database strains model applied in Brazil. **INTERNATIONAL SEMINAR ON AVIAN SALMONELLOSIS UBABEF**, 2011.

FRIEDMAN, A. B., E.; SKALAN, D. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. **World Poultry Science Journal**, n. 6, p. 209-220, 2003.

FUSSELL, L. W. Poultry industry strategies for control of immunosuppressive diseases. **Poult Sci**, v. 77, n. 8, p. 1193-6, Aug 1998.

GAMAZO, C. I., J. M. **Salmonella vaccines**. Formatex Research Centre. Spain: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology 2007.

GAST, R. K.; BEARD, C. W. Production of Salmonella enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens. **Avian Dis**, v. 34, n. 2, p. 438-46, Apr-Jun 1990.

GAST, R. K.; PORTER, R. E., JR.; HOLD, P. S. Applying tests for specific yolk antibodies to predict contamination by Salmonella enteritidis in eggs from experimentally infected laying hens. **Avian Dis**, v. 41, n. 1, p. 195-202, Jan-Mar 1997.

HASSAN, J. O.; CURTISS, R., 3RD. Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live avirulent Salmonella typhimurium strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous Salmonella serotypes. **Infect Immun**, v. 62, n. 12, p. 5519-27, Dec 1994a.

HASSAN, J. O.; CURTISS, R., 3RD. Virulent Salmonella typhimurium-induced lymphocyte depletion and immunosuppression in chickens. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 2027-36, May 1994b.

HASSAN, J. O.; MOCKETT, A. P.; CATTY, D.; BARROW, P. A. Infection and reinfection of chickens with Salmonella typhimurium: bacteriology and immune responses. **Avian Dis**, v. 35, n. 4, p. 809-19, Oct-Dec 1991.

HASSAN, J. O.; PORTER, S. B.; CURTISS, R., 3RD. Effect of infective dose on humoral immune responses and colonization in chickens experimentally infected with Salmonella typhimurium. **Avian Dis**, v. 37, n. 1, p. 19-26, Jan-Mar 1993.

HENDERSON, S. C.; BOUNOUS, D. I.; LEE, M. D. Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. **Infect Immun**, v. 67, n. 7, p. 3580-6, Jul 1999.

INOUE, A. Y.; BERCHIERI, A., JR.; BERNARDINO, A.; PAIVA, J. B.; STERZO, E. V. Passive immunity of progeny from broiler breeders vaccinated with oil-emulsion bacterin against Salmonella enteritidis. **Avian Dis**, v. 52, n. 4, p. 567-71, Dec 2008.

IQBAL, M.; PHILBIN, V. J.; WITHANAGE, G. S.; WIGLEY, P.; BEAL, R. K.; GOODCHILD, M. J.; BARROW, P.; MCCONNELL, I.; MASKELL, D. J.; YOUNG, J.; BUMSTEAD, N.; BOYD, Y.; SMITH, A. L. Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with Salmonella enterica serovar typhimurium. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 2344-50, Apr 2005.

J.S. BAILEY, A. R., P.S. HOLT, C.L. HOFACRE, J.L. WILSON, D.E. COSBY, L.J. RICHARDSON AND N.A. COX. Humoral and Mucosal-Humoral Immune Response to a Salmonella vaccination Program in Broiler Breeders. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 9, 2007.

JONES, M. A.; WIGLEY, P.; PAGE, K. L.; HULME, S. D.; BARROW, P. A. Salmonella enterica Serovar Gallinarum Requires the Salmonella Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System but Not the Salmonella Pathogenicity Island

1 Type III Secretion System for Virulence in Chickens. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5471-5476, September 1, 2001 2001.

KAISER, M. G.; LAKSHMANAN, N.; WING, T.; LAMONT, S. J. Salmonella enterica serovar enteritidis burden in broiler breeder chicks genetically associated with vaccine antibody response. **Avian Dis**, v. 46, n. 1, p. 25-31, Jan-Mar 2002.

KAISER, M. G.; LAMONT, S. J. Genetic line differences in survival and pathogen load in young layer chicks after Salmonella enterica serovar enteritidis exposure. **Poult Sci**, v. 80, n. 8, p. 1105-8, Aug 2001.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis and Salmonella gallinarum. **Microbiology**, v. 146 Pt 12, p. 3217-26, Dec 2000.

KANASHIRO, A.; STOPPA, G.; CARDOSO, A.; TESSARI, E.; CASTRO, A. Serovars of Salmonella spp isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, p. 195-198, 2005.

KEERY, I. Salmonella Enteritidis control programs in the Canadian poultry industry. 2010. Acesso em: December.

KINGSLEY, R. A.; HUMPHRIES, A. D.; WEENING, E. H.; DE ZOETE, M. R.; WINTER, S.; PAPAConstantinopoulou, A.; DOUGAN, G.; BÄUMLER, A. J. Molecular and Phenotypic Analysis of the CS54 Island of Salmonella enterica Serotype Typhimurium: Identification of Intestinal Colonization and Persistence Determinants. **Infect Immun**, v. 71, n. 2, p. 629-640, February 1, 2003 2003.

KINGSLEY, R. A.; SANTOS, R. L.; KEESTRA, A. M.; ADAMS, L. G.; BÄUMLER, A. J. Salmonella enterica serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 895-905, 2002.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 163-182, 2012.

LILLEHOJ, E. P.; YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S. Vaccines against the avian enteropathogens Eimeria, Cryptosporidium and Salmonella. **Anim Health Res Rev**, v. 1, n. 1, p. 47-65, Jun 2000.

LIU, W.; YANG, Y.; CHUNG, N.; KWANG, J. Induction of humoral immune response and protective immunity in chickens against Salmonella enteritidis after a single dose of killed bacterium-loaded microspheres. **Avian Dis**, v. 45, n. 4, p. 797-806, Oct-Dec 2001.

MASTROENI, P.; CHABALGOITY, J. A.; DUNSTAN, S. J.; MASKELL, D. J.; DOUGAN, G. Salmonella: Immune responses and vaccines. **Veterinary Journal**, v. 161, n. 2, p. 132-164, Mar 2001.

MASTROENI, P.; VILLARREAL-RAMOS, B.; DE HORMAECHE, R. D.; HORMAECHE, C. E. Delayed (footpad) hypersensitivity and Arthus reactivity using protein-rich antigens and LPS in mice immunized with live attenuated

aroA salmonella vaccines. **Microbial Pathogenesis**, v. 14, n. 5, p. 369-379, 1993.

MCCLELLAND, J. W.; KEENAN, D. P.; LEWIS, J.; FOERSTER, S.; SUGERMAN, S.; MARA, P.; WU, S.; LEE, S.; KELLER, K.; HERSEY, J.; LINDQUIST, C. Review of evaluation tools used to assess the impact of nutrition education on dietary intake and quality, weight management practices, and physical activity of low-income audiences. **J Nutr Educ**, v. 33 Suppl 1, p. S35-48, 2001.

METHNER, U.; BARROW, P. A.; BERNDT, A.; RYCHLIK, I. Salmonella Enteritidis with double deletion in *phoP*/*fliC*--a potential live Salmonella vaccine candidate with novel characteristics for use in chickens. **Vaccine**, v. 29, n. 17, p. 3248-53, Apr 12 2011.

METHNER, U.; STEINBACH, G. [Efficacy of maternal Salmonella antibodies and experimental oral infection of chicks with Salmonella enteritidis]. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 110, n. 10, p. 373-7, Oct 1997.

METHNER, U.; STEINBACH, G.; MEYER, H. [The effectiveness of Salmonella immunization of broiler breeders on the Salmonella colonization of the animals and their progeny after experimental oral infection]. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 107, n. 6, p. 192-8, Jun 1994.

MIAO, E. A.; ANDERSEN-NISSEN, E.; WARREN, S. E.; ADEREM, A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. **Semin Immunopathol**, v. 29, n. 3, p. 275-88, Sep 2007.

MIYAMOTO, T.; KITAOKA, D.; WITHANAGE, G. S.; FUKATA, T.; SASAI, K.; BABA, E. Evaluation of the efficacy of Salmonella enteritidis oil-emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. **Avian Dis**, v. 43, n. 3, p. 497-505, Jul-Sep 1999.

MONACK, D. M.; BOULEY, D. M.; FALKOW, S. Salmonella typhimurium Persists within Macrophages in the Mesenteric Lymph Nodes of Chronically Infected *Nramp1*<sup>+/+</sup> Mice and Can Be Reactivated by IFN $\gamma$  Neutralization. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 2, p. 231-241, January 19, 2004 2004.

MORGAN, E.; CAMPBELL, J. D.; ROWE, S. C.; BISPHAM, J.; STEVENS, M. P.; BOWEN, A. J.; BARROW, P. A.; MASKELL, D. J.; WALLIS, T. S. Identification of host-specific colonization factors of Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 994-1010, 2004.

NICHOLAS, R. A.; CULLEN, G. A. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to Salmonella enteritidis in chicken flocks. **Vet Rec**, v. 128, n. 4, p. 74-6, Jan 26 1991.

OCHOA-REPARAZ, J.; SESMA, B.; ALVAREZ, M.; JESUS RENEDO, M.; IRACHE, J. M.; GAMAZO, C. Humoral immune response in hens naturally infected with Salmonella Enteritidis against outer membrane proteins and other surface structural antigens. **Vet Res**, v. 35, n. 3, p. 291-8, May-Jun 2004.

OIE. Prevention, detection and control of Salmonella in poultry. **Terrestrial Animal Health Code**, 2011.

PARKER, C.; ASOKAN, K.; GUARD-PETTER, J. Egg contamination by Salmonella serovar enteritidis following vaccination with Delta-aroA Salmonella serovar typhimurium. **FEMS Microbiol Lett**, v. 195, n. 1, p. 73-8, Feb 5 2001.

PAULIN, S. M.; JAGANNATHAN, A.; CAMPBELL, J.; WALLIS, T. S.; STEVENS, M. P. Net Replication of Salmonella enterica Serovars Typhimurium and Choleraesuis in Porcine Intestinal Mucosa and Nodes Is Associated with Their Differential Virulence. **Infect Immun**, v. 75, n. 8, p. 3950-3960, August 2007 2007.

PAULIN, S. M.; WATSON, P. R.; BENMORE, A. R.; STEVENS, M. P.; JONES, P. W.; VILLARREAL-RAMOS, B.; WALLIS, T. S. Analysis of Salmonella enterica Serotype-Host Specificity in Calves: Avirulence of S. enterica Serotype Gallinarum Correlates with Bacterial Dissemination from Mesenteric Lymph Nodes and Persistence In Vivo. **Infect Immun**, v. 70, n. 12, p. 6788-6797, December 1, 2002 2002.

PENHA FILHO, R. A.; DE PAIVA, J. B.; ARGUELLO, Y. M.; DA SILVA, M. D.; GARDIN, Y.; RESENDE, F.; BERCHIERI JUNIOR, A. B.; SESTI, L. Efficacy of several vaccination programmes in commercial layer and broiler breeder hens against experimental challenge with Salmonella enterica serovar Enteritidis. **Avian Pathol**, v. 38, n. 5, p. 367-75, Oct 2009.

PENHA FILHO, R. A.; MOURA, B. S.; DE ALMEIDA, A. M.; MONTASSIER, H. J.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JUNIOR, A. Humoral and cellular immune response generated by different vaccine programs before and after Salmonella Enteritidis challenge in chickens. **Vaccine**, v. 30, n. 52, p. 7637-43, Dec 14 2012.

PICKLER, L.; HAYASHI, R. M.; LOURENÇO, M. C.; MIGLINO, L. B.; CARON, L. F.; BEIRÃO, B. C. B.; SILVA, A. V. F.; SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com Salmonella Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 27-36, 2012.

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S. H. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate Salmonella vaccine strain? **Microbes Infect**, v. 3, n. 14-15, p. 1261-9, Nov-Dec 2001.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P. Resistência antimicrobiana em Salmonella Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1259-1262, 2008.

SETTA, A. M.; JONES, M. A.; BARROW, P. A. Cytokines and chemokines expression in avian cells infected with Salmonella enterica. **Cytokine**, v. 48, n. 1-2, p. 65-66, 10// 2009.

SPRINGER, S.; LEHMANN, J.; LINDNER, T.; THIELEBEIN, J.; ALBER, G.; SELBITZ, H. J. [A new live Salmonella enteritidis vaccine for chickens--experimental evidence of its safety and efficacy]. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 113, n. 6, p. 246-52, Jun 2000.

SPRINGER, S.; LINDNER, T.; AHRENS, M.; WOITOW, G.; PRANDINI, F.; SELBITZ, H. J. Duration of immunity induced in chickens by an attenuated live Salmonella enteritidis vaccine and an inactivated Salmonella

enteritidis/typhimurium vaccine. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 124, n. 3-4, p. 89-93, Mar-Apr 2011.

STECHER, B.; ROBBIANI, R.; WALKER, A. W.; WESTENDORF, A. M.; BARTHEL, M.; KREMER, M.; CHAFFRON, S.; MACPHERSON, A. J.; BUER, J.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; VON MERING, C.; HARDT, W.-D. Salmonella enterica Serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Compete with the Intestinal Microbiota. **PLoS Biol**, v. 5, n. 10, p. e244, 2007.

STEELE-MORTIMER, O.; BRUMELL, J. H.; KNODLER, L. A.; MÉRESSE, S.; LOPEZ, A.; FINLAY, B. B. The invasion-associated type III secretion system of Salmonella enterica serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 43-54, 2002.

STUTTARD, C. Genetic analysis of thr mutations in Salmonella typhimurium. **J Bacteriol**, v. 116, n. 1, p. 1-11, Oct 1973.

SUZUKI, K.; MEEK, B.; DOI, Y.; MURAMATSU, M.; CHIBA, T.; HONJO, T.; FAGARASAN, S. Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 7, p. 1981-1986, February 17, 2004 2004.

TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. The role of Public Health Laboratory in the problem os salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 119-127, 1996.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M.; IRINO, K. Changing patterns of Salmonella serovars: increase of Salmonella enteritidis in Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 38, n. 5, p. 315-22, Sep-Oct 1996.

THORNS, C. J.; TURCOTTE, C.; GEMMELL, C. G.; WOODWARD, M. J. Studies into the role of the SEF14 fimbrial antigen in the pathogenesis of Salmonella enteritidis. **Microb Pathog**, v. 20, n. 4, p. 235-46, Apr 1996.

TIMMS, L. M.; MARSHALL, R. N.; BRESLIN, M. F. Laboratory and Field Trial Assessment of Protection Given by a Salmonella-Enteritidis Pt4 Inactivated, Adjuvant Vaccine. **British Veterinary Journal**, v. 150, n. 1, p. 93-102, Jan-Feb 1994.

UTHE, J. J.; ROYAE, A.; LUNNEY, J. K.; STABEL, T. J.; ZHAO, S.-H.; TUGGLE, C. K.; BEARSON, S. M. D. Porcine differential gene expression in response to Salmonella enterica serovars Choleraesuis and Typhimurium. **Mol Immunol**, v. 44, n. 11, p. 2900-2914, 2007.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a Salmonella enteritidis strain. **Dev Comp Immunol**, v. 26, n. 4, p. 355-64, May 2002.

VAN IMMERSEEL, F.; METHNER, U.; RYCHLIK, I.; NAGY, B.; VELGE, P.; MARTIN, G.; FOSTER, N.; DUCATELLE, R.; BARROW, P. A. Vaccination and early protection against non-host-specific Salmonella serotypes in poultry:

exploitation of innate immunity and microbial activity. **Epidemiol Infect**, v. 133, n. 6, p. 959-78, Dec 2005.

WEENING, E. H.; BARKER, J. D.; LAARAKKER, M. C.; HUMPHRIES, A. D.; TSOLIS, R. M.; BAUMLER, A. J. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. **Infect Immun**, v. 73, n. 6, p. 3358-66, Jun 2005.

WEGENER, H. C.; HALD, T.; LO FO WONG, D.; MADSEN, M.; KORSGAARD, H.; BAGER, F.; GERNER-SMIDT, P.; MOLBAK, K. *Salmonella* control programs in Denmark. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 7, p. 774-80, Jul 2003.

WINTER, S. E.; THIENNIMITR, P.; WINTER, M. G.; BUTLER, B. P.; HUSEBY, D. L.; CRAWFORD, R. W.; RUSSELL, J. M.; BEVINS, C. L.; ADAMS, L. G.; TSOLIS, R. M.; ROTH, J. R.; BAUMLER, A. J. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. **Nature**, v. 467, n. 7314, p. 426-429, 2010.

WOODWARD, M. J.; GETTINBY, G.; BRESLIN, M. F.; CORKISH, J. D.; HOUGHTON, S. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. **Avian Pathol**, v. 31, n. 4, p. 383-92, Aug 2002.

YOUNG, S. D.; OLUSANYA, O.; JONES, K. H.; LIU, T.; LILJEBJELKE, K. A.; HOFACRE, C. L. *Salmonella* Incidence in Broilers from Breeders Vaccinated with Live and Killed *Salmonella*. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, n. 4, p. 521-528, Winter 2007 2007.

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A. K.; BARROW, P. A. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. **Vaccine**, v. 17, n. 20-21, p. 2538-2545, 6/4/ 1999.

## **CAPÍTULO 2**

**VACINAÇÃO COM BACTERINA DE SALMONELLA ENTERITIDIS E SALMONELLA MINNESOTA EM MATRIZES DE FRANGOS DE CORTE: CONTROLE DA COLONIZAÇÃO E RESPOSTA IMUNE NA PROGÊNIE DESAFIADA**

# VACINAÇÃO COM BACTERINA DE SALMONELLA ENTERITIDIS E SALMONELLA MINNESOTA EM MATRIZES DE FRANGOS DE CORTE: CONTROLE DA COLONIZAÇÃO E RESPOSTA IMUNE NA PROGÊNIE DESAFIADA

(Bacterins of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Minnesota vaccination in Broiler Breeders: Control of Intestinal Colonization and Immune Response in Challenged Progeny)

## RESUMO

Dentre as doenças transmitidas por alimentos, a salmonelose é a que mais preocupa os consumidores e produtores de aves, pois na maioria dos casos de toxinfecção por este agente, carne de aves ou derivados estão envolvidos. Ao longo dos últimos anos, percebe-se que, sempre quando se estabelece controle para um sorovar, ocorre alternância de prevalência para outro sorovar da mesma espécie. Esse comportamento, aliado a enorme quantidade de sorovares conhecidos, leva a crer que o sucesso no controle desse agente está associado a diversas ações, dentre elas, o uso de vacinas. O presente trabalho foi desenvolvido para estudar a Vacinação de Matrizes de Frangos de Corte com bacterina de *Salmonella* Enteritidis e Minnesota sobre o controle da colonização da progênie desafiada com essas bactérias vivas. Foi observado, em frangos de um dia, que o grupo oriundo de reprodutoras vacinadas com SE e SM apresentaram maior quantidade de células CD4+ no íleo e CD8+ no ceco. Aos sete dias após o desafio, a progênie destas reprodutoras também apresentaram menor colonização por *Salmonella* no fígado que frangos

oriundos de reprodutoras vacinadas com SE, porém não houve diferença para a colonização do ceco, papo e fígado aos três, 14 e 21 dias após desafio.

**Palavras-Chave:** salmonelose em aves; resposta imune, imunoistoquímica.

**ABSTRACT**

Among several foodborne illnesses, salmonellosis is the main concern to consumers and producers of broilers, because poultry meat or derivatives are normally involved in toxoinfection. Over the past few years, it is noticed that, whenever control for a serovar is established, replacement to another serovar of the same species occurs. This behavior, coupled with the huge amount of known serovars, suggests that success in controlling this agent is associated with several actions, such as vaccine usage. To a better understanding about the use of vaccines in controlling *Salmonella*, this study was carried out to evaluate the vaccination of broiler breeders with *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Minnesota bacterins on the colonization control in progeny after challenged with these bacteria". It was observed, in chickens of 1 day, that the group descendant of vaccinated breeders with SE and SM showed higher amount of CD4 + cells in the ileum and CD8 + in the cecum. At 7 days after challenge, the progeny from these breeders also had lower colonization in the liver than birds from breeders vaccinated with SE, but no difference in colonization of cecum, crop and liver at three, 14 and 21 days after challenge was found.

**Keywords:** avian salmonellosis, immune response, immunohistochemistry.

## INTRODUÇÃO

*Salmonella enterica* é o principal agente de doenças transmitidas por alimentos em seres humanos, e os produtos de origem avícola (carnes e derivados) estão frequentemente envolvidos nestes casos de toxinfecção alimentares (WHO, 2007).

Recentemente a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (WHO) identificaram a necessidade de maiores informações sobre a efetividade das medidas de controle adotadas para redução de *Salmonella* spp. em frangos de corte, não só nos abatedouros, mas também em granjas de criação (FAO, 2009).

Dentro da cadeia de produção do frango de corte a transmissão vertical, proveniente de lotes de matrizes infectados e, posteriormente, a disseminação horizontal desse agente no incubatório ou nos aviários é bastante comum, principalmente para os sorovares Enteritidis e Typhimurium (Heyndrickx et al., 2002). Por isso, a vacinação de reprodutoras tem se tornado uma importante ferramenta que, associada a outras medidas de biossegurança, podem auxiliar no controle da disseminação deste microrganismo (Zhang-Barber et al., 1999).

É conhecido que vacinas vivas contra *Salmonella* conferem uma melhor proteção, já que estas estimulam tanto a resposta imunológica celular com presença de linfócitos T CD8+ ativados, quanto humoral com a produção de imunoglobulinas (IgA) secretórias (Van Immerseel et al., 2005; Penha Filho et al., 2012), enquanto que as vacinas inativadas, resultam em uma resposta baseada na produção de linfócitos T CD4+ e uma grande produção de anticorpos (Chatfield et al., 1993). O uso de vacinas inativadas (bacterinas) tem se mostrado eficiente na redução da colonização intestinal e no

desaparecimento de sinais clínicos em infecções por *Salmonella* Enteritidis. Entretanto, foi comprovado que seu uso é mais efetivo na redução da colonização de órgãos e diminuindo a excreção fecal do que na eliminação do agente (Inoue et al., 2008; Young et al., 2007).

O fato é que, os mecanismos de proteção para desafios por *Salmonella* foram amplamente discutidos e estudados para os sorovares Pullorum e Gallinarum (Berchieri et al., 2000; Neto et al., 2007; Ribeiro et al., 2009), Typhimurium (Berndt e Methner, 2001; Hassan e Curtiss Iii, 1994) e Enteritidis (Okamura et al., 2001; Miyamoto et al., 1997; Guard-Petter, 2001) em aves. Porém, não existe muita informação sobre as formas de transmissão, a resposta imunológica nas aves e a eficiência da imunidade passiva transmitida à progênie no combate às infecções por outros sorovares de *Salmonella*, além dos já mencionados.

No Brasil, somente vacinas inativadas contra *Salmonella* Enteritidis são aprovadas para uso em reprodutoras de frangos de corte. O uso de vacinas inativadas autógenas também é permitido, mediante autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2003).

O objetivo desse trabalho foi medir a eficácia do uso de uma vacina inativada contra *Salmonella* Minnesota associada a um programa vacinal utilizando vacina inativada contra *Salmonella* Enteritidis, em reprodutoras, no controle da colonização e na dinâmica celular de mucosa intestinal da progênie, quando essa foi desafiada com *Salmonella* Enteritidis ou Minnesota.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e Tratamentos Experimentais**

A execução do experimento foi aprovada pelo Comitê de Ética em experimentação animal do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, protocolado com o número 004/2012.

Foram utilizados 150 frangos de corte de um dia, divididos em um experimento fatorial 2 (vacinação de reprodutoras) x 3 (desafio na progênie) com 6 tratamentos, cada um com 25 pintinhos de acordo com a TABELA 1. As aves foram oriundas do mesmo lote de matrizes COBB<sup>®</sup>, vacinadas com uma dose de 0,5 mL de vacina inativada (Bio-Enteritidis<sup>®</sup>, partida 800/11, fabricação 09/2011, vencimento 09/2013) contra *Salmonella* Enteritidis (SE) às 11 e 18 semanas de vida. Duas mil matrizes desse lote foram identificadas no tarso com anilhas coloridas e receberam a mesma vacina contra SE (na mesma idade e dosagem) e mais uma dose (nas mesmas idades) contra *Salmonella* Minnesota (vacina autógena, autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, processo 21052.005412/2011-61). Ambas as vacinas utilizadas apresentavam o título de  $1 \times 10^8$  UFC/dose e eram microemulsionadas em adjuvante oleoso.

TABELA 1. Tratamentos Experimentais.

Nº Aves	Vacinação das Reprodutoras	Desafio nos frangos de corte
25	<i>Salmonella</i> Enteritidis	Controle
25	<i>Salmonella</i> Enteritidis + Minnesota	Controle
25	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Enteritidis
25	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Minnesota
25	<i>Salmonella</i> Enteritidis + Minnesota	<i>Salmonella</i> Enteritidis
25	<i>Salmonella</i> Enteritidis + Minnesota	<i>Salmonella</i> Minnesota

Com trinta semanas de idade, os ovos das matrizes vacinadas com SE ou SE+SM foram coletados e incubados em bandejas separadas, na mesma incubadora, de acordo com as recomendações de incubação da linhagem (COBB, 2008). As progênies foram desafiadas, de acordo com cada

tratamento, no primeiro dia e alojadas em salas-isoladores separadas, mas idênticas, com pressão negativa, previamente limpas, desinfetadas e com cama de maravalha previamente esterilizada em autoclave 121° C/15 minutos.

Todo material utilizado foi lavado e autoclavado ou desinfetado com aspersão de hidróxido de amônia. Foram realizados testes de esterilidade nas salas, equipamentos e cama antes do início do experimento. Os animais foram mantidos durante 21 dias com fornecimento de água e ração *ad libitum* com dieta formulada de acordo com o NRC (2004).

### **Coleta de Material para Análises**

Ao primeiro dia do experimento, cinco aves foram eutanasiadas e necropsiadas para pesquisa de *Salmonella* em papo, ceco e fígado para confirmar a negatividade para *Salmonella* sp.

Aos três, 7 e 14 dias, cinco aves de cada um dos grupos foram eutanasiadas, usando deslocamento cervical, e realizada a coleta asséptica do ceco e fígado para análise qualitativa e quantitativa de *Salmonella* sp. Aos 21 dias, além do ceco e fígado, foram coletados fragmentos do papo de cinco aves para análise qualitativa para *Salmonella* sp. Ainda foram coletados fragmentos do íleo e ceco de aves com antes do desafio e três e sete dias após desafio, para análise quantitativa de células calciformes, linfócitos T CD4+ e CD8+.

### **Preparo dos inóculos com as cepas e desafio das aves**

Para o preparo do inóculo de *Salmonella* Enteritidis, foi utilizada uma colônia pura isolada de frangos de corte, retirada do Ágar estoque e incubada

em solução de BHI (Brain Heart Infusion) por 24h a 37°C. Em seguida, o conteúdo dessa solução foi semeado com *swab* em uma placa de Agar Mueller Hinton e incubada por 24h a 37°C. Na sequência, a placa foi lavada, com solução de NaCl 0,85% esterilizada. A cultura bacteriana foi diluída seriadamente (1:10), também em solução NaCl esterilizada, até atingir a concentração correspondente à escala 0,5 de MacFarland, a qual corresponde à concentração de  $10^8$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *Salmonella* Enteritidis/mL (Pickler et al., 2012). Foram feitas diluições decimais seriadas em tubos contendo 9 mL de NaCl 0,85% esterilizada até atingir a concentração de  $10^5$  UFC/mL. Cada uma das diluições foi semeada em placas de Agar PCA (Plate Count Agar, Oxoid®) para contagem de colônias.

O preparo do inóculo de *Salmonella* Minnessota, obedeceu aos mesmos passos descritos para *Salmonella* Enteritidis, utilizando uma colônia também isolada de frangos de corte, que encontrava-se em Agar estoque.

Os frangos foram desafiados com uso de sonda oral, no primeiro dia de vida, com 1mL de uma solução contendo  $10^5$  UFC/mL de SE ou SM de acordo com cada tratamento.

### **Análises Microbiológicas**

Para realização do procedimento de contagem de *Salmonella* sp. as amostras dos fragmentos de papo, ceco e fígado foram maceradas e diluídas em água peptonada 2% em proporção de 1:9 (1g de fragmento para 9 mL de água peptonada). Foi retirado 1 mL da solução inicial de água peptonada 2% que foi pipetada em tubo contendo 9mL de água peptonada 0,1% e assim sucessivamente, até a diluição  $10^{-3}$ . Posteriormente, foram retirados 100µL de

cada diluição e dispensados nas placas em duplicata em ágar verde brilhante com 1% de novobiocina, espalhando-se o líquido pela superfície da placa com uma alça de vidro. As placas foram incubadas em estufa regulada a 35°C por 24h e submetidas à contagem das colônias.

As soluções iniciais de água peptonada 2% foram incubadas a 35°C por 24h. Após esse período foram transferidos 100µL de cada solução inicial para tubos com 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e 1 mL para um tubo contendo 10 mL de caldo Tetracionato, e incubados em estufa 42°C por 24h, para confirmação da presença ou ausência de *Salmonella sp.*

Os resultados das contagens de colônias foram realizados de acordo com Procedimentos de Contagem de Colônias da Normativa nº62 publicada em 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003b). Os valores dos resultados da contagem de colônias de *Salmonella* foram transformados em Log<sub>10</sub> para análise estatística.

### **Análises Histológicas e Imunoistoquímicas**

As amostras de íleo e ceco foram coletadas em solução de formalina tamponada 10% e outras porções destes mesmos segmentos foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido.

Para as análises de células calciformes, as amostras foram incluídas em parafina, seccionadas com 5µm de espessura e coradas com Hematoxilina & Eosina adicionada de coloração azul de algodão, sendo posteriormente analisadas em microscopia de luz com ampliação de 100 vezes (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA). Vinte campos microscópicos foram analisados em cada grupo experimental, para cada segmento intestinal,

totalizando 120 campos por segmento intestinal por grupo experimental(adaptado de Santin et al., 2001).

Para a análise imunoistoquímica de linfócitos T CD4+ e T CD8+, as amostras foram incluídas em gel Tissue-Tek O. C. T. (Miles, Elkhart IN, US), congeladas em nitrogênio líquido, seccionadas com 5µm de espessura em um aparelho criostato e fixadas em lâminas carregadas positivamente em acetona 100%. Em seguida foi realizada a re-hidratação com PBS 0,1M pH 7,6, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por cinco minutos e proteína bloqueadora por oito minutos. Os anticorpos primários utilizados foram Anti-CD4 (CT-4 Southern Biotech 1:100) e Anti-CD8 (CT-8 Southern Biotech 1:100), incubados por 90 minutos a 37°C. Para detecção da reação foi utilizado anticorpo secundário anti-camundongo e anti-coelho combinados num mesmo sistema de amplificação, kit ADVANCE<sup>®</sup>, por 30 minutos. Para revelação da reação utilizou-se cromógeno, kit DAB<sup>®</sup>, por 30 segundos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Meyer, lavadas em água com posterior desidratação e montagem das mesmas.

Campos microscópicos com presença de células positivas foram quantificados em microscopia de luz com ampliação de 100X (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA). Foram analisados 20 campos por segmento intestinal para cada grupo experimental, totalizando 120, para cada marcador de superfície celular.

### **Análise Estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para identificar se os dados eram paramétricos ou não. Dados paramétricos foram submetidos à

análise de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de Tukey a 5%. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%. Para as análises microbiológicas, as contagens de colônias foram transformadas em Log 10 previamente à análise estatística. O software utilizado foi o Statistix 9<sup>®</sup>.

## RESULTADOS

### Microbiologia

Na TABELA 2 são apresentados os resultados das contagens de colônias (três e sete dias). Para os dados de 14 e 21 dias, houve crescimento bacteriano apenas após enriquecimento em meios seletivos, por esse motivo, os resultados estão expressos em porcentual de positividade em relação às amostras analisadas. Pode-se observar que aos três, 14 e 21 dias, frangos desafiados apresentaram significativamente maior colonização dessa bactéria quando comparado a animais não desafiados, embora não tenha sido observado diferença entre o tipo de sorovar utilizado no desafio. Aos sete dias houve interação entre os fatores desafio e vacinação das reprodutoras para contagem de *Salmonella*, onde frangos desafiados com SM, provenientes de reprodutoras vacinadas somente com SE apresentaram maior contagem de *Salmonella* no fígado quando comparado a frangos desafiados com SM de reprodutoras vacinadas com SE+SM.

TABELA 2. Contagem de *Salmonella* em fragmentos de fígado nos diferentes tratamentos, onde SE = *Salmonella* Enteritidis, SM = *Salmonella* Minnesota e ND= Não Desafiadas.

TRATAMENTOS		EFEITOS PRINCIPAIS			
		Log(10)		% de Positividade	
		3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
VACINA	SE	1,84±0,37	1,31±0,28	60%	53%
	SE+SM	1,36±0,34	0,78±0,18	60%	53%
DESAFIO	ND	0,00±0,00b	0,00±0,00b	0%b	0%b
	SE	2,47±0,34a	1,49±0,26a	90%a	80%a
	SM	2,34±0,28a	1,65±0,24a	90%a	80%a
Vacina	Desafio	EFEITOS DAS INTERAÇÕES			
SE	ND	0,00±0,00	0,00±0,00c	0	0
SE+SM	ND	0,00±0,00	0,00±0,00c	0	0
SE	SE	2,37±0,98	1,64±0,35ab	80%	80%
SE	SM	2,35±0,55	2,30±0,20a	100%	80%
SE+SM	SE	2,10±1,35	1,34±0,34b	100%	80%
SE+SM	SM	2,35±1,36	1,00±0,00b	80%	80%
		Probabilidades			
Vacina (P1)		0,347	0,128	1,000	1,000
Desafio (P2)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
(P1) x (P2)		>0,001	<0,001	>0,001	>0,001

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no teste de Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ).

A TABELA 3 apresenta o percentual de amostras positivas de *Salmonella* no ceco dos frangos de corte nas diferentes idades e tratamentos. Para os resultados de ceco, foi observado crescimento bacteriano somente após o enriquecimento em meios seletivos. Por esse motivo, os resultados estão expressos em percentual de positividade em relação ao total de amostras analisadas. Nestes resultados observa-se somente o efeito do desafio, onde aves desafiadas apresentam maior positividade que aves não desafiadas, não havendo diferença entre os sorovares utilizados. Resultados semelhantes foram observados nas amostras de papo de aves aos 21 dias, conforme apresentado na TABELA 4.

TABELA 3. Porcentual de amostras positivas em fragmentos de ceco nos diferentes tratamentos onde SE = *Salmonella* Enteritidis, SM = *Salmonella* Minnesota e ND = Não desafiadas.

TRATAMENTOS		EFEITOS PRINCIPAIS			
		% Positividade			
		3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
VACINA	SE	53%	53%	66%	60%
	SE+SM	60%	66%	66%	66%
DESAFIO	ND	0% <sup>b</sup>	0% <sup>b</sup>	0% <sup>b</sup>	0% <sup>b</sup>
	SE	100% <sup>a</sup>	100% <sup>a</sup>	100% <sup>a</sup>	100% <sup>a</sup>
	SM	70% <sup>a</sup>	80% <sup>a</sup>	100% <sup>a</sup>	90% <sup>a</sup>
Vacina	Desafio	Efeito das Interações			
SE	ND	0%	0%	0%	0%
SE+SM	ND	0%	0%	0%	0%
SE	SE	100%	100%	100%	100%
SE	SM	60%	60%	100%	80%
SE+SM	SE	100%	100%	100%	100%
SE+SM	SM	80%	100%	100%	100%
		Probabilidades			
Vacina (P1)		0,724	0,473	1,000	0,716
Desafio (P2)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
(P1) x (P2)		>0,001	>0,0001	>0,001	>0,001

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no teste de Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ).

TABELA 4. Porcentual de amostras positivas em fragmentos de papo aos 21 dias de idade, onde SE = *Salmonella* Enteritidis, SM = *Salmonella* Minnesota e ND = Não desafiadas.

TRATAMENTOS		EFEITOS PRINCIPAIS
		% Positividade 21 dias
VACINA	SE	46%
	SE+SM	66%
DESAFIO	ND	0% <sup>b</sup>
	SE	90% <sup>a</sup>
	SM	80% <sup>a</sup>
VACINA x DESAFIO	ND	0%
	ND	0%
	SE x SE	80%
	SE x SM	60%
	SE+SM x SE	100%
	SE + SM x SM	100%
		Probabilidade
Vacina (P1)		0,2849
Desafio (P2)		<0,0001
(P1) x (P2)		>0,0001

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no teste de Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ).

### Imunoistoquímica

A TABELA 5 mostra a quantidade de linfócitos T CD4+ e T CD8+ no íleo e ceco das aves no primeiro dia de vida, antes do desafio. Observa-se que frangos de reprodutoras vacinadas com bacterina contra SE e SM apresentam maior quantidade de linfócitos T CD4+ e menor quantidade de linfócitos T CD8+ no íleo e ceco e maior quantidade de linfócitos T CD8+ no ceco, quando comparados a frangos de reprodutoras vacinadas somente com bacterina contra SE.

TABELA 5. Média e erro padrão da contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+ em íleo e ceco de frangos de corte às 0 horas de idade nos diferentes tratamentos, onde SE = *Salmonella* Enteritidis, SM = *Salmonella* Minnesota.

VACINAÇÃO REPRODUTORAS	ÍLEO			CECO		
	CD4+	CD8+	CD4:CD8	CD4+	CD8+	CD4:CD8
SE	1,55±0,24b	4,00±0,53a	0,71±0,15b	1,95±0,31b	5,90±0,33b	0,34±0,06
SE+SM	3,40±0,24a	1,00±0,19b	2,73±0,31a	3,20±0,46a	7,45±0,45a	0,43±0,05
Valor de P	<0,001	<0,001	<0,001*	0,010	0,013	<0,297*

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ou Tukey\* (P<0,05)

Analisando a TABELA 6 observou-se interação entre os fatores vacina de reprodutoras e desafio na progênie para todas as células estudadas na mucosa do íleo e ceco de frangos, aos três dias de idade.

TABELA 6. Média e erro padrão da contagem de células caliciformes, linfócitos T CD4+ e T CD8+ em íleo e ceco de frangos de corte aos 3 dias de idade nos diferentes tratamentos, onde SE = *Salmonella* Enteritidis, SM = *Salmonella* Minnesota e ND = Não desafiadas.

TRATAMENTOS		EFEITOS PRINCIPAIS							
		ILEO				CECO			
		CAL	CD4	CD8	CD4:CD8	CAL	CD4	CD8	CD4:CD8
VACINA	SE	15,73±0,29b	9,38±0,45a	2,72±0,20	4,02±0,02a	7,17±0,50a	2,45±0,18a	8,02±0,60	0,51±0,07a
	SE+SM	17,51±0,42a	7,92±0,55b	3,10±0,21	3,17±0,42b	4,27±0,28b	1,90±0,13b	8,78±0,46	0,26±0,02b
DESAFIO	ND	15,65±0,40b	10,30±0,49a	2,10±0,19b	5,44±0,54a	4,95±0,29ab	2,22±0,20ab	6,00±0,57b	0,61±0,10a
	SE	15,00±0,24b	7,25±0,35b	2,80±0,25b	3,10±0,38b	4,80±0,47b	1,75±0,12b	11,92±0,53a	0,16±0,01b
	SM	19,22±0,40a	8,40±0,84ab	3,82±0,23a	2,47±0,29b	7,40±0,71a	2,55±0,23a	7,27±0,43b	0,37±0,03a
VACINA	DESAFIO	DESDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES							
SE	ND	14,35±0,44d	8,15±0,36b	2,25±0,24bc	4,50±0,51ab	5,35±0,36b	2,60±0,36ab	2,80±0,19b	1,02±0,15a
SE+SM	ND	16,95±0,54bc	12,45±0,62a	1,95±0,30c	6,62±0,97a	4,55±0,44b	1,85±0,15ab	9,20±0,45a	0,21±0,02bc
SE	SE	15,30±0,34bcd	6,70±0,47bc	1,85±0,25c	3,84±0,70ab	5,30±0,74b	1,85±0,18ab	12,10±0,73a	0,17±0,02c
SE	SM	17,55±0,42ab	13,30±0,55a	4,05±0,30a	3,72±0,36ab	10,85±0,76a	2,90±0,33a	9,15±0,59a	0,33±0,03b
SE+SM	SE	14,70±0,35cd	7,80±0,50b	3,75±0,30a	2,37±0,24bc	4,30±0,56b	1,65±0,17b	11,75±0,79a	0,16±0,02c
SE+SM	SM	20,90±0,45a	3,50±0,33c	3,60±0,35ab	1,21±0,20c	3,95±0,46b	2,20±0,33ab	5,40±0,22b	0,41±0,06ab
		Probabilidades							
Vacina(P1)		0,002	0,035	0,151	0,005	<0,001	0,027	0,300	0,004
Desafio(P2)		<0,001	0,001	<0,001	<0,001	0,009	0,035	<0,001	<0,001
(P1) x (P2)		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,031	<0,001	<0,001

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ )

Nesta idade, comparando frangos desafiados com SM, oriundos de reprodutoras vacinadas contra SE frente a frangos de reprodutoras vacinadas contra SE+SM (FIGURAS 3, 4 e 5) observa-se que os primeiros aumentaram o número de linfócitos T CD4+ no íleo e T CD8+ no ceco. Estes mesmos animais, provenientes de reprodutoras vacinadas contra SE e desafiados com SM, apresentaram maior contagem de linfócitos T CD4+ no íleo e T CD8+ no ceco quando comparado ao grupo não desafiado.

Como resumo do que ocorre aos três dias após desafio pode-se dizer que, em frangos cujas reprodutoras foram vacinadas contra SE, somente o desafio com SM aumenta a presença de linfócitos T CD4+ e T CD8+ no íleo, quando comparado ao desafio com SE (FIGURA 1), e que nas análises microbiológicas, ocorreu maior isolamento de *Salmonella* em fígado e ceco, independente do sorovar utilizado no desafio (TABELAS 2 e 3).

Quando os frangos são oriundos de reprodutoras vacinadas com SE+SM, também não existe diferença no isolamento de *Salmonella* no fígado e ceco aos três dias após o desafio com SM, porém os frangos apresentam redução de linfócitos T CD4+ no íleo e T CD8+ no ceco quando comparados aos frangos de reprodutoras vacinadas contra SE+SM e desafiados com SE. Essas células já se encontravam em maior proporção também em frangos deste grupo ao primeiro dia de idade (TABELA 5).

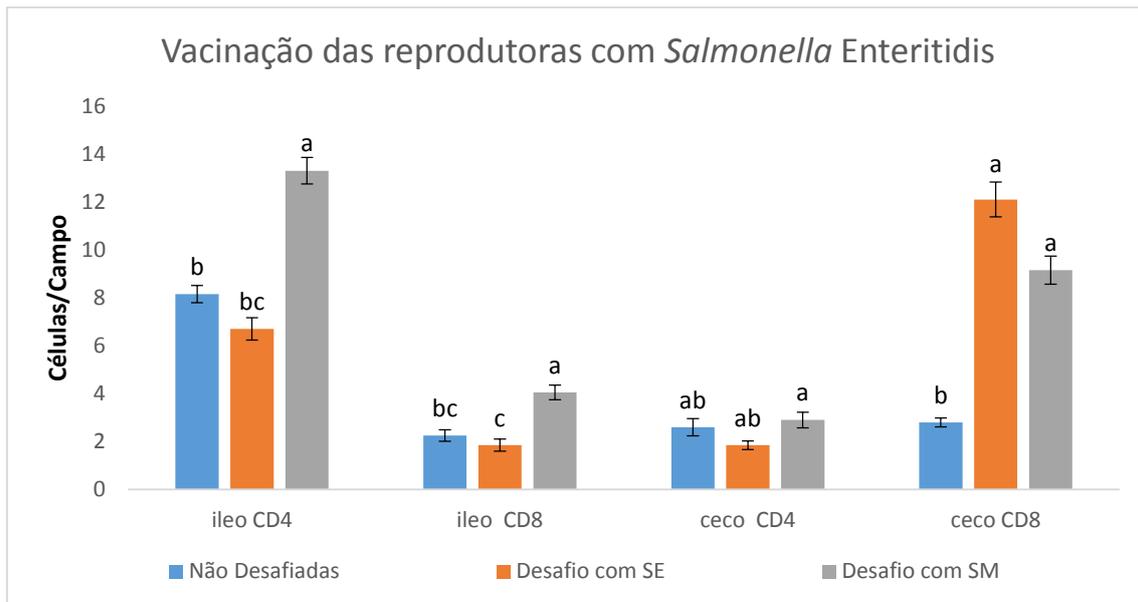


FIGURA 1. Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE frente a diferentes desafios, aos 3 dias de idade. Letras diferentes sob as colunas nos mesmos órgãos indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

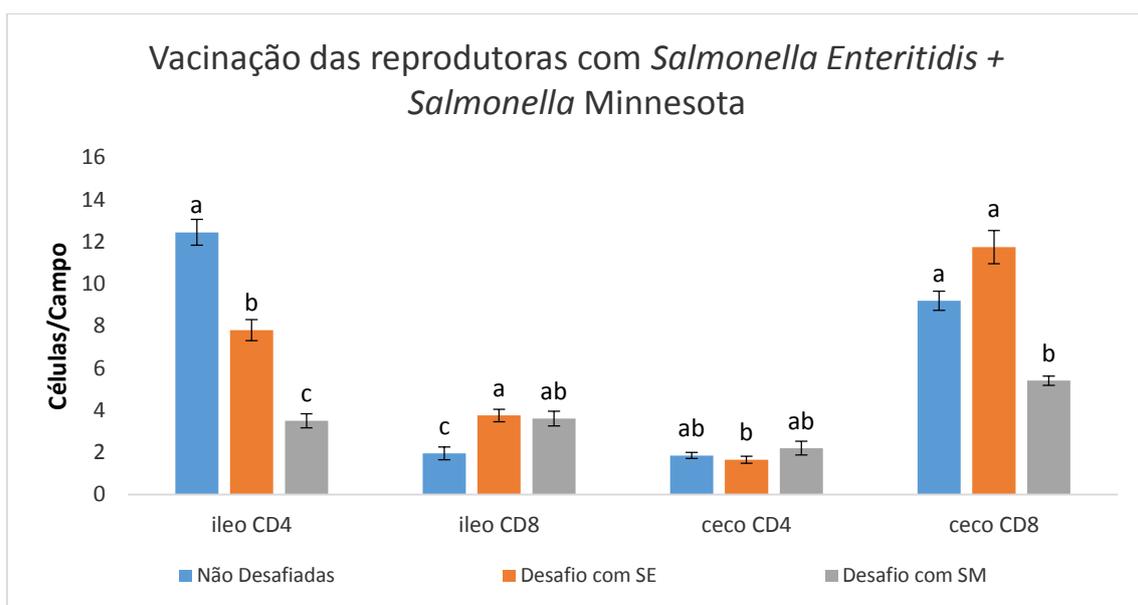


FIGURA 2. Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE+ SM frente a diferentes desafios, aos 3 dias de idade. Letras diferentes sob as colunas nos mesmos órgãos indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

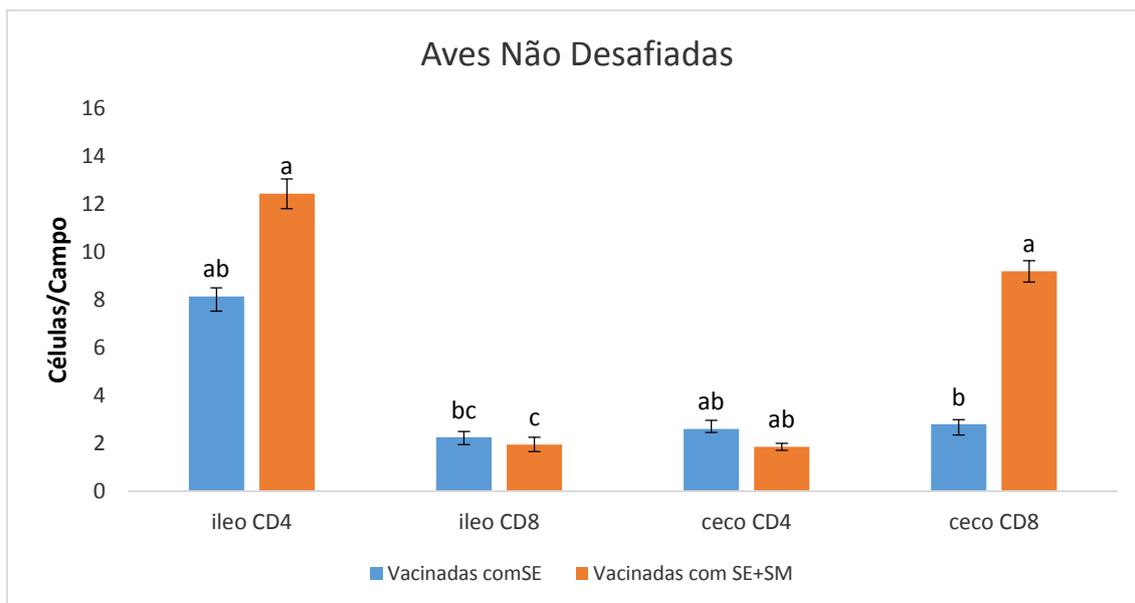


FIGURA 3. Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM não desafiados, aos 3 dias de idade. Letras diferentes sob as colunas nos mesmos órgãos indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

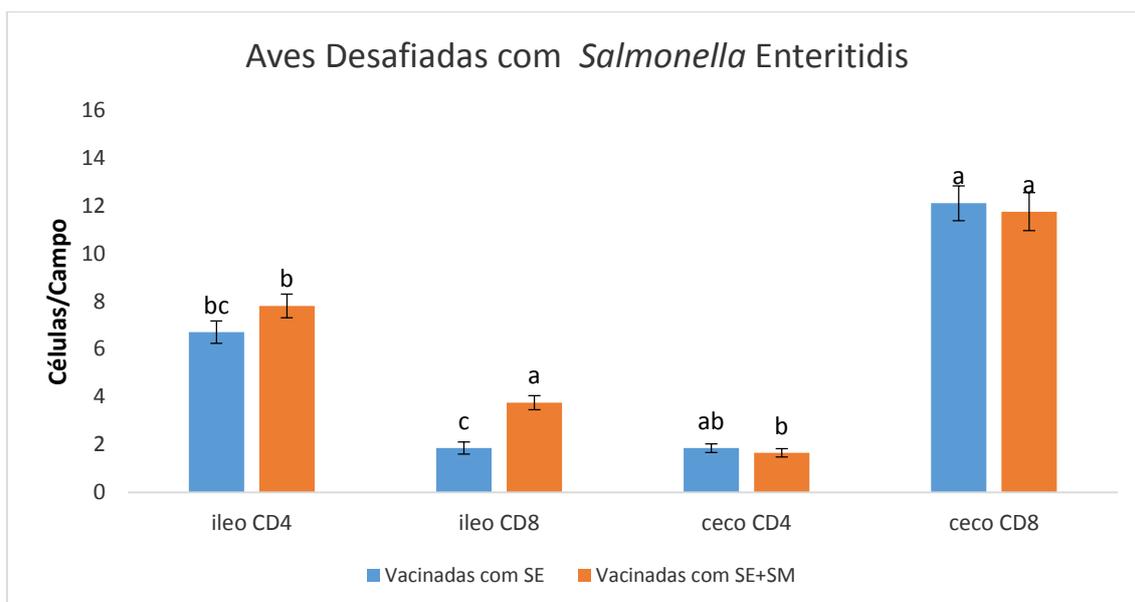


FIGURA 4. Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM desafiados com SE, aos 3 dias de idade. Letras diferentes sob as colunas nos mesmos órgãos indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

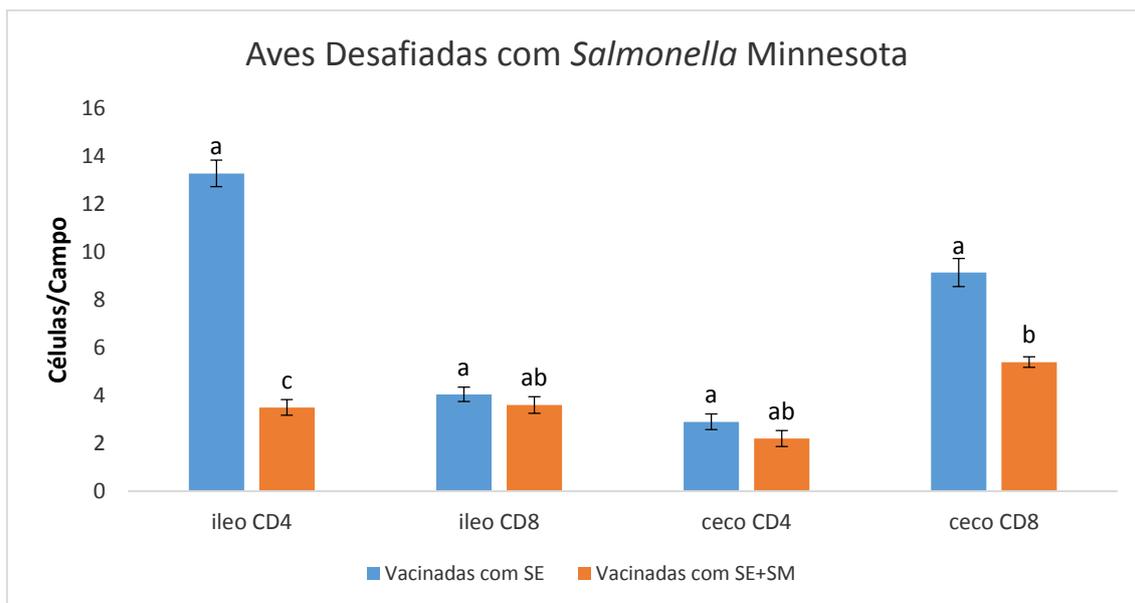


FIGURA 5. Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM desafiados com SM, aos 3 dias de idade. Letras diferentes sob as colunas nos mesmos órgãos indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

Aos sete dias após desafio (TABELA 7), observa-se que frangos de reprodutoras vacinadas contra SE+SM apresentam menor quantidade de células caliciformes, linfócitos TCD4+ e T CD8+ no íleo quando não desafiados. No desafio com SE apresentam maior número de linfócitos T CD4+ no íleo e menor número de linfócitos T CD8+ no ceco quando comparados a aves provenientes de reprodutoras vacinadas somente com SE.

TABELA 7. Média e erro padrão da contagem de células caliciformes, linfócitos T CD4+ e T CD8+ em íleo e ceco de frangos de corte aos 7 dias de idade nos diferentes tratamentos, onde SE = *Salmonella* Enteritidis, SM = *Salmonella* Minnesota e SD = Sem desafio.

TRATAMENTOS		EFEITOS PRINCIPAIS							
		ILEO				CECO			
		CAL	CD4	CD8	CD4:CD8	CAL	CD4	CD8	CD4:CD8
VACINA	SE	22,60±0,49	11,55±0,55	7,73±0,48	1,96±0,21	4,70±0,34a	6,27±0,50a	6,08±0,57	1,59±0,18a
	SE+SM	23,07±0,63	11,38±0,68	7,22±0,24	1,66±0,10	3,40±0,25b	3,95±0,31b	5,38±0,36	0,95±0,12b
DESAFIO	SEM	19,80±0,44b	14,32±0,49a	8,90±0,48a	1,75±0,08	2,92±0,32b	4,70±0,51	5,55±0,45	1,13±0,18
	SE	24,02±0,76a	12,97±0,76a	8,10±0,32a	1,70±0,12	4,57±0,38a	4,77±0,49	6,82±0,76	0,91±0,09
	SM	24,67±0,57a	7,10±0,43b	5,42±0,40b	1,99±0,32	4,65±0,37a	5,85±0,59	4,82±0,47	1,75±0,25
VACINA	DESAFIO	DEDOBRAMENTO DAS INTERAÇÕES							
SE	SD	21,60±2,09c	16,55±0,58a	11,20±2,04a	1,52±0,07ab	2,95±0,48b	4,95±0,76b	5,10±0,56ab	1,19±0,23b
SE+SM	SD	18,00±2,15d	12,10±0,37b	6,60±1,88c	1,98±0,14a	2,90±0,44b	4,45±0,71b	6,00±0,71ab	1,08±0,29b
SE	SE	22,05±5,18bc	9,25±0,57bc	8,40±2,38b	1,17±0,10bc	5,45±0,56a	5,55±0,87ab	9,35±1,27a	0,83±0,13b
SE	SM	24,15±3,08abc	8,85±0,50bc	3,60±1,60d	3,20±0,53a	5,70±0,54a	8,30±0,79a	3,80±0,48b	2,73±0,75a
SE+SM	SE	26,00±3,48a	16,70±0,77a	7,80±1,68bc	2,22±0,12a	3,70±0,45ab	4,00±0,43b	4,30±0,27b	0,99±0,13b
SE+SM	SM	25,20±4,03ab	5,35±0,45c	7,25±1,89bc	0,78±0,07c	3,60±0,41ab	3,40±0,44b	5,85±0,75ab	0,77±0,18b
		Probabilidades							
Vacina(P1)		0,559*	0,847	0,339*	0,998	0,004	<0,001	0,978	0,005
Desafio(P2)		<0,001*	<0,001	<0,001*	0,227	0,001	0,310	0,100	0,098
(P1)x(P2)		<0,001*	<0,001	<0,001*	<0,001	0,002	0,002	0,001	<0,001

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ou Tukey\* (P<0,05)

Os frangos de reprodutoras vacinadas com SE+SM e desafiados com SM apresentam redução no número de linfócitos T CD4+ no íleo e ceco e aumento de linfócitos T CD8+ no íleo quando comparados aqueles de reprodutoras vacinadas somente com SE.

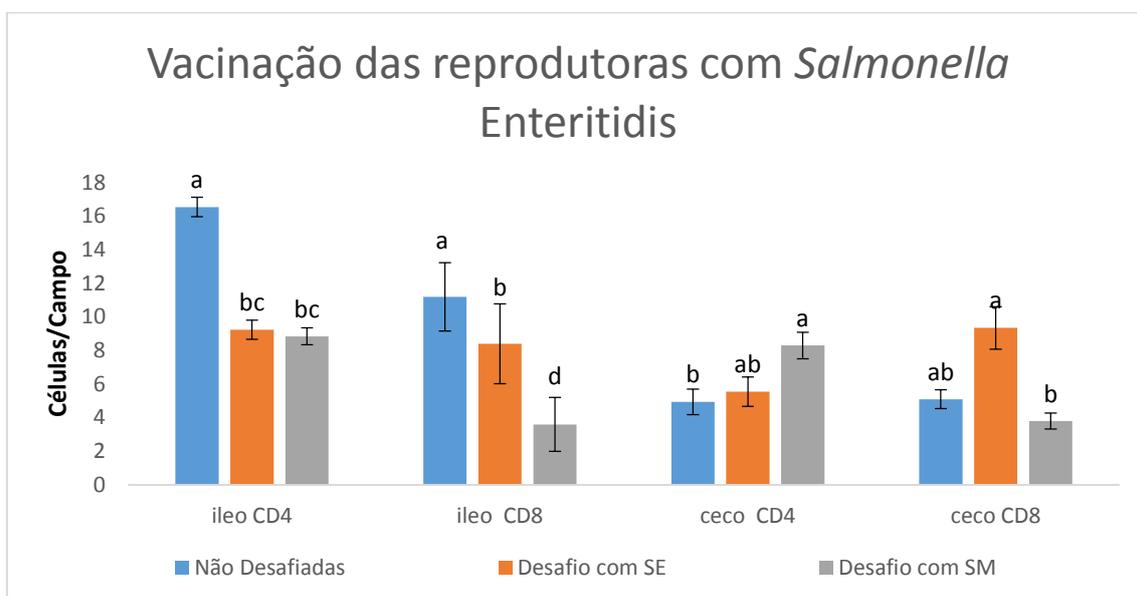


FIGURA 6. Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE frente a diferentes desafios, aos 7 dias de idade. Letras diferentes sob as colunas nos mesmos órgãos indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

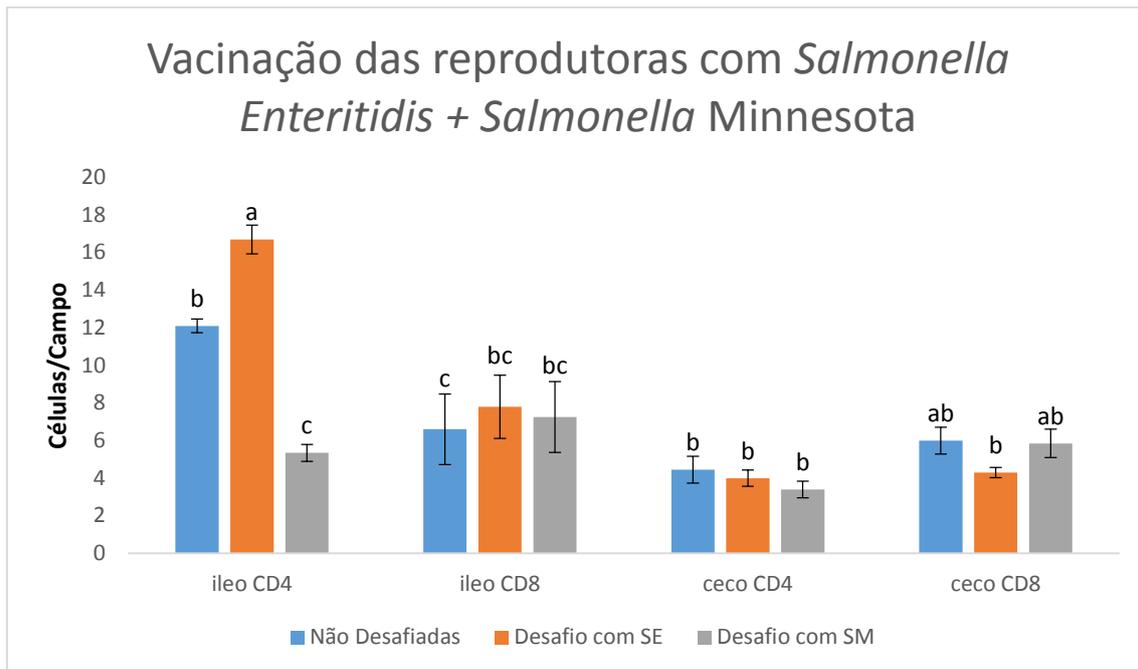


FIGURA 7. Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE+ SM frente a diferentes desafios, aos 7 dias de idade. Letras diferentes sob as colunas nos mesmos órgãos indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

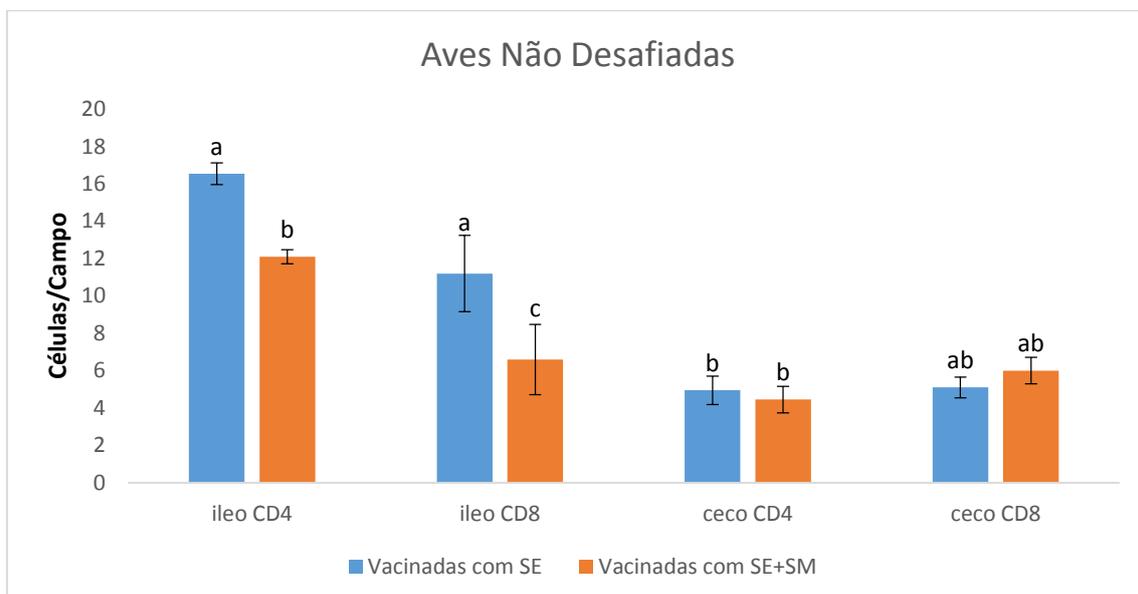


FIGURA 8. Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM não desafiados, aos 7 dias de idade. Letras diferentes sob as colunas nos mesmos órgãos indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

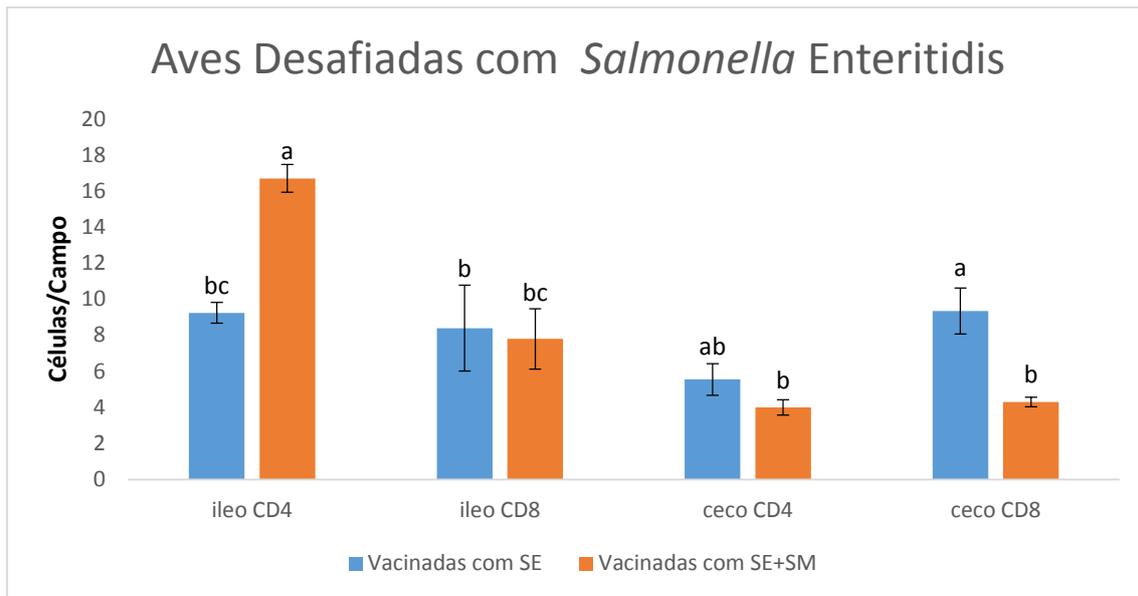


FIGURA 9. Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM desafiados com SE, aos 7 dias de idade. Letras diferentes sob as colunas nos mesmos órgãos indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

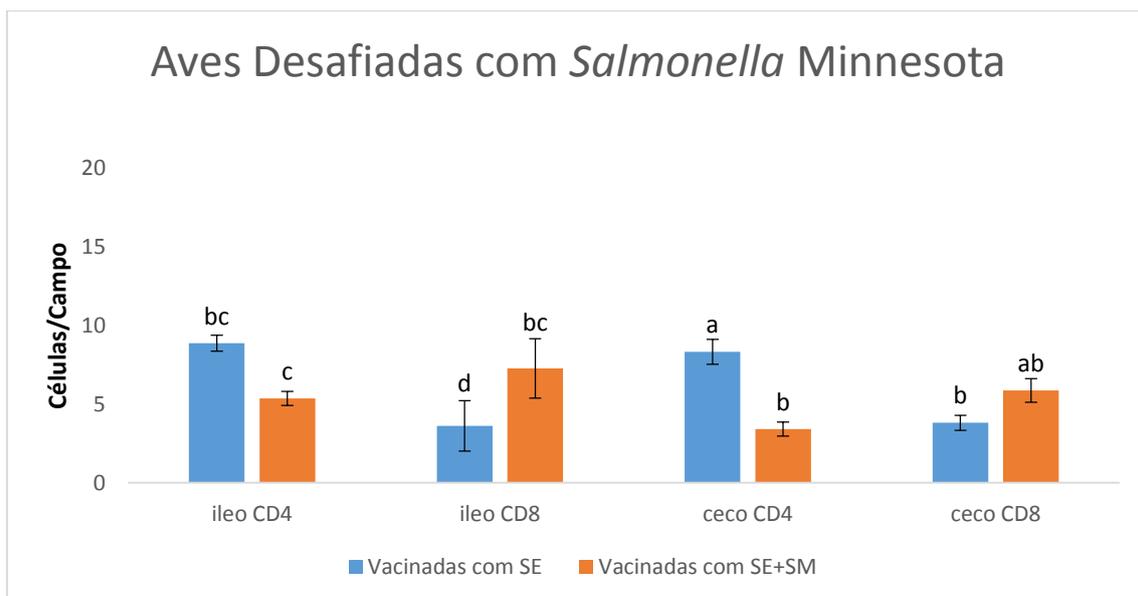


FIGURA 10. Desdobramento da interação: Média e erro padrão da contagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no íleo e ceco de frangos de corte de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+ SM desafiados com SM, aos 7 dias de idade. Letras diferentes sob as colunas nos mesmos órgãos indicam diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Diversos autores tem relatado a vacinação contra *Salmonella* em reprodutoras como uma importante medida preventiva (Mastroeni et al., 2001; Van Immerseel et al., 2005; Inoue et al., 2008; Berghaus et al., 2011; Penha Filho et al., 2012) da disseminação da bactéria na progênie. É conhecido que a principal resposta imune às vacinações utilizando bacterinas inativadas é a humoral (Tran et al., 2010) e a importância desta resposta imune no controle da infecção foi demonstrada em um estudo de Mastroeni et al. (2000), onde a depleção de células B em ratos fez com que os animais apresentassem menor resistência às infecções por *Salmonella* e ainda maior excreção do microrganismo nas fezes quando comparado aos grupos controles.

Methner e Steinbach (1997) observaram menor contagem de SE no ceco de progênies de reprodutoras vacinadas (vacina inativada) contra SE do que o grupo de progênies de reprodutoras não vacinadas. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Inoue et al. (2008), que desafiaram progênies no 1º e no 14º dias de idade e observaram menor percentual de isolamento de SE nas progênies das reprodutoras vacinadas do que na progênie de reprodutoras não vacinadas.

No presente estudo, não foi utilizado progênies oriundas de lotes de matrizes não vacinados, o que não nos permite comparar os resultados desse estudo com aqueles apresentados anteriormente (Methner e Steinbach, 1997; Inoue et al., 2008). Entretanto, comparando o presente estudo com outros que utilizaram a mesma metodologia, mas com progênie de reprodutoras não vacinadas (Muniz et al., 2013; Lourenço et al., 2013; Pickler et al., 2012), observou-se que, enquanto aqueles autores conseguiram encontrar contagens de *Salmonella* nos mesmos

órgãos, em nosso estudo conseguiu-se isolar amostras positivas mediante enriquecimento em meios seletivos. Isso sugere que, apesar de não existir uma diferença substancial de proteção da progênie entre os tratamentos vacinais utilizados nas reprodutoras do presente estudo, a colonização da progênie pode ser diminuída quando comparada a progênie de reprodutoras não vacinadas, porém não é totalmente efetiva para controlar a disseminação do agente na progênie desafiado no primeiro dia de vida.

No fígado dos animais, aos sete dias após desafio foi observado que a vacinação de reprodutoras contra SE+SM diminuiu a quantidade de *Salmonella* isolada em frangos desafiados com SM quando comparada com frangos de reprodutoras vacinadas somente contra SE também desafiados com SM. Entretanto nos demais órgãos e idades não foi possível encontrar diferença entre as bacterinas utilizadas nas matrizes em relação à proteção da progênie, pois um grande número de amostras eram positivas, demonstrando que a imunidade passiva não foi capaz de proteger as aves da colonização do trato gastrintestinal. De acordo com Methner et al. (2002), os anticorpos passivos advindos de reprodutoras vacinadas não possuem uma ação efetiva no intestino, o que está de acordo com nossos resultados microbiológicos de papo e ceco, onde não houve redução no isolamento destas bactérias.

Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Young et al. (2007) utilizando bacterinas contra *Salmonella* Hadar, Kentucky e Heidelberg nas reprodutoras e observando que não houve redução significativa no número de amostras positivas nos grupos oriundos de matrizes vacinadas em relação aos grupos provenientes de matrizes não vacinadas.

Os linfócitos T CD4+ e CD8+ são células chaves nas respostas imunes contra *Salmonella*. Segundo Arstila et al. (1994), as células T CD4+ são responsáveis pela ativação de macrófagos e a modulação da resposta imune. As células T CD8+ estão envolvidas com reconhecimento e eliminação de antígenos intracelulares (Sevil Domenech et al., 2008).

A administração de vacinas inativadas para reprodutoras induz a uma forte produção de anticorpos, principalmente IgG, que são transferidos para a progênie e persistem por algumas semanas (Methner e Steinbach, 1997; Methner et al., 2002). Entretanto, não se conhece ainda como a vacinação de reprodutoras pode ter efeito sobre os componentes da resposta imune adaptativa que possam ser transferidos para a progênie.

No presente estudo foi avaliada somente a presença de linfócitos T CD4+ e T CD8+, e notou-se que as progênies cujas reprodutoras foram expostas a mais de um tipo de antígeno (vacinadas com SE + SM), apresentaram uma contagem maior de linfócitos T CD4+ no íleo e linfócitos T CD8+ no ceco. Em um estudo com crianças de até dois anos de idade, Roduit et al., (2011) concluiu que a exposição da mãe à diferentes antígenos durante o período de gestação, teve um efeito protetivo nos seus filhos. As crianças cujas mães tiveram contato com maior número de antígenos apresentaram maior expressão de *Toll-Like Receptors* comparado aquelas de mães que viviam em ambiente mais limpo. Esses TLRs estão presentes na superfície de algumas células imunes. Sabe-se que, para uma resposta imune ser realmente efetiva, é necessária uma boa coordenação entre o sistema imune inato e o adaptativo. Desde o reconhecimento do antígeno pelas células dendríticas, neutrófilos ou macrófagos por meio dos TLRs presentes nessas células, passando pela ativação dos linfócitos B e T, resultando na eliminação do agente ou célula

infectada e ainda gerando uma memória imunológica (Medzhitov, 2008). Estudos avaliando a presença dos TLRs em nosso estudo poderiam nos ajudar a identificar a expressão ou não das quantidades e dos diferentes TLRs nas progênes de cada programa vacinal.

Van Immerseel et al., (2002) descreveram uma intensa migração de Linfócitos T (até o sexto dia pós inoculação) na mucosa do ceco de aves SPF (Specific Pathogens Free) de um dia de idade, desafiadas oralmente com SE, propondo que a presença dessas células na mucosa é causada pelo agente. Dados semelhantes foram encontrados no nosso estudo para as contagens de linfócitos T CD8+ nas aves desafiadas com SE, independente do programa vacinal das reprodutoras, sugerindo que a intensidade da resposta causada pelo desafio com SE tenha sido maior do que aquela causada pelo desafio com SM. Berndt et al., (2007), inoculando aves SPF de um dia de idade, com diferentes sorovares de *Salmonella* e avaliando a quantidade de linfócitos T CD8+ no ceco das aves, às quatro horas, dois, quatro, sete e nove dias pós inoculação (pi), observou maior quantidade dessas células para o grupo desafiado com SE, com pico na contagem aos quatro dias pi. Mesmo o estudo tendo sido conduzido com aves SPF, o comportamento do número dessas células foi semelhante ao encontrado no presente estudo, já que, independente do programa vacinal de reprodutoras, encontramos contagens de linfócitos T CD8+ alta no ceco de frangos desafiados com SE.

Apesar de não ter sido observada nenhuma diferença no isolamento de *Salmonella* no ceco dos frangos de corte oriundos de reprodutoras vacinadas com SE ou SE+SM, pode-se perceber que frangos de reprodutoras vacinadas com SE+SM apresentaram maior quantidade de linfócitos T CD8+ no íleo quando

desafiadas com SE. Já quando desafiados com SM, apresentaram menor quantidade de linfócitos T CD4+ no íleo e T CD8+ no ceco, quando comparado as progênes das reprodutoras vacinadas contra SE aos três dias de idade. Entretanto, aos sete dias, o número de linfócitos T CD8+ no íleo e ceco de frangos de reprodutoras vacinadas com SE+SM e desafiados com SM foi maior que em frangos de reprodutoras vacinadas somente com SE, demonstrando que existiu uma interferência na dinâmica de linfócitos T CD4+ e CD8+ na mucosa intestinal da progênie em resposta a vacinação das reprodutoras, porém mais estudos avaliando citocinas e outros marcadores são necessários para entender melhor este efeito.

## **CONCLUSÃO**

No presente estudo, a associação da bacterina contra SM com a bacterina já utilizada contra SE, em reprodutoras, foi eficaz na diminuição da colonização de SM no fígado da progênie, aos sete dias após desafio. Entretanto, não foi eficaz no controle da colonização deste órgão aos três, 14 e 21 dias. Nenhum dos programas vacinais foi eficaz na proteção da colonização do ceco e papo das progênes nas diferentes idades.

A associação das bacterinas SE+SM em reprodutoras também modificou a dinâmica de células caliciformes, linfócitos T CD4+ e T CD8+ na mucosa do íleo e ceco da progênie quando comparada com aves provenientes de reprodutoras vacinadas somente contra SE, entretanto mais estudos são necessários para entender esses acontecimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARSTILA, T. P.; VAINIO, O.; LASSILA, O. Central role of CD4+ T cells in avian immune response. **Poult Sci**, v. 73, n. 7, p. 1019-26, Jul 1994.
- BERCHIERI, A.; DE OLIVEIRA, G. H.; PINHEIRO, L. A. S.; BARROW, P. A. Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hen lines. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 50-52, Jan-Mar 2000.
- BERGHAUS, R. D.; THAYER, S. G.; MAURER, J. J.; HOFACRE, C. L. Effect of Vaccinating Breeder Chickens with a Killed *Salmonella* Vaccine on *Salmonella* Prevalences and Loads in Breeder and Broiler Chicken Flocks. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 5, p. 727-734, May 2011.
- BERNDT, A.; METHNER, U. Gamma/delta T cell response of chicken after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella* Typhimurium strains. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 78, p. 18, 2001.
- BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken cecum immune response to *Salmonella* enterica serovars of different levels of invasiveness. **Infect Immun**, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, Dec 2007.
- BRASIL. Instrução Normativa 78. 2003a.
- BRASIL. Instrução Normativa nº62. 2003b.
- BUCHER, O.; FAZIL, A.; RAJIC, A.; FARRAR, A.; WILLS, R.; MCEWEN, S. A. Evaluating interventions against *Salmonella* in broiler chickens: applying synthesis research in support of quantitative exposure assessment. **Epidemiol Infect**, v. 140, n. 5, p. 925-45, May 2012.
- CHATFIELD, S.; ROBERTS, M.; LONDONO, P.; CROPLEY, I.; DOUCE, G.; DOUGAN, G. The development of oral vaccines based on live attenuated *Salmonella* strains. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 7, n. 1, p. 1-7, Jun 1993.
- COBB. Guia de Manejo de Incubação. 2008.
- FAO, W. *Salmonella* and Campylobacter in chicken meat: Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series. 2009.
- GUARD-PETTER, J. The chicken, the egg and *Salmonella* enteritidis. **Environ Microbiol**, v. 3, n. 7, p. 421-30, Jul 2001.
- HASSAN, J. O.; CURTISS III, R. Development and evaluation of oral vaccination program using live avirulent *Salmonella* typhimurium to protect vaccinated chickens against challenge with homologous and heterologous *Salmonella* serotypes. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 8, 1994.
- HEYNDRICKX, M.; VANDEKERCHOVE, D.; HERMAN, L.; ROLLIER, I.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. **Epidemiol Infect**, v. 129, n. 2, p. 253-65, Oct 2002.
- INOUE, A. Y.; BERCHIERI, A., JR.; BERNARDINO, A.; PAIVA, J. B.; STERZO, E. V. Passive immunity of progeny from broiler breeders vaccinated with oil-emulsion bacterin against *Salmonella* enteritidis. **Avian Dis**, v. 52, n. 4, p. 567-71, Dec 2008.
- LOURENÇO, M. C.; KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; MIGLINO, L. B.; PICKLER, L.; KRAIESKI, A. L.; SANTIN, E. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e

controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 11-14, 2013.

MASTROENI, P.; CHABALGOITY, J. A.; DUNSTAN, S. J.; MASKELL, D. J.; DOUGAN, G. *Salmonella*: Immune responses and vaccines. **Veterinary Journal**, v. 161, n. 2, p. 132-164, Mar 2001.

MASTROENI, P.; SIMMONS, C.; FOWLER, R.; HORMAECHE, C. E.; DOUGAN, G. Igh-6(-/-) (B-cell-deficient) mice fail to mount solid acquired resistance to oral challenge with virulent *Salmonella* enterica serovar typhimurium and show impaired Th1 T-cell responses to *Salmonella* antigens. **Infect Immun**, v. 68, n. 1, p. 46-53, Jan 2000.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, Jul 24 2008.

METHNER, U.; KEILING, S.; KREUTZER, B.; SCHWEINITZ, P. [Will the effectiveness of the immunization of chicks with live *Salmonella* vaccines be affected by maternal antibodies?]. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v. 109, n. 4, p. 149-53, Apr 2002.

METHNER, U.; STEINBACH, G. [Efficacy of maternal *Salmonella* antibodies and experimental oral infection of chicks with *Salmonella* enteritidis]. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 110, n. 10, p. 373-7, Oct 1997.

MIYAMOTO, T.; BABA, E.; TANAKA, T.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. *Salmonella* enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. **Avian Dis**, v. 41, n. 2, p. 296-303, Apr-Jun 1997.

MUNIZ, E. C.; PICKLER, L.; LOURENÇO, M. C.; WESTPHAL, P.; KURITZA, L. N.; SANTIN, E. **PROBIÓTICOS NA RAÇÃO PARA O CONTROLE DE *Salmonella* Minnesota EM FRANGOS DE CORTE.** 2013.

NETO, O. C. F.; ARROYAVE, W.; ALESSI, A. C.; FAGLIARI, J. J.; BERCHIERI, A. Infection of commercial laying hens with *Salmonella* Gallinarum: Clinical, anatomopathological and haematological studies. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 2, p. 133-141, Jun 2007.

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, v. 45, n. 1, p. 8, 2001.

PENHA FILHO, R. A.; MOURA, B. S.; DE ALMEIDA, A. M.; MONTASSIER, H. J.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JUNIOR, A. Humoral and cellular immune response generated by different vaccine programs before and after *Salmonella* Enteritidis challenge in chickens. **Vaccine**, v. 30, n. 52, p. 7637-43, Dec 14 2012.

PICKLER, L.; HAYASHI, R. M.; LOURENÇO, M. C.; MIGLINO, L. B.; CARON, L. F.; BEIRÃO, B. C. B.; SILVA, A. V. F.; SANTIN, E. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 27-36, 2012.

RIBEIRO, S. A. M.; DE PAIVA, J. B.; ZOTESSO, F.; LEMOS, M. V. F.; BERCHIERI, A. Molecular Differentiation between *Salmonella* Enterica Subsp Enterica Serovar

Pullorum and *Salmonella* Enterica Subsp Enterica Serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 184-188, Jan-Mar 2009.

RODUIT, C.; WOHLGENSINGER, J.; FREI, R.; BITTER, S.; BIELI, C.; LOELIGER, S.; BUCHELE, G.; RIEDLER, J.; DALPHIN, J. C.; REMES, S.; ROPONEN, M.; PEKKANEN, J.; KABESCH, M.; SCHAUB, B.; VON MUTIUS, E.; BRAUN-FAHRLANDER, C.; LAUENER, R.; GROUP, P. S. Prenatal animal contact and gene expression of innate immunity receptors at birth are associated with atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 1, p. 179-85, 185 e1, Jan 2011.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; MACARI, M.; GRECCO, M.; SANCHEZ, J. C.; OKADA, T. M.; MYASAKA, A. M. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 10, n. 3, p. 236-244, Fal 2001.

SEVIL DOMENECH, V. E.; PANTHEL, K.; WINTER, S. E.; RUSSMANN, H. Heterologous prime-boost immunizations with different *Salmonella* serovars for enhanced antigen-specific CD8 T-cell induction. **Vaccine**, v. 26, n. 15, p. 1879-86, Mar 28 2008.

TRAN, T. Q.; QUESSY, S.; LETELLIER, A.; DESROSIERS, A.; BOULIANNE, M. Immune response following vaccination against *Salmonella* Enteritidis using 2 commercial bacterins in laying hens. **Can J Vet Res**, v. 74, n. 3, p. 185-92, Jul 2010.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* enteritidis strain. **Dev Comp Immunol**, v. 26, n. 4, p. 355-64, May 2002.

VAN IMMERSEEL, F.; METHNER, U.; RYCHLIK, I.; NAGY, B.; VELGE, P.; MARTIN, G.; FOSTER, N.; DUCATELLE, R.; BARROW, P. A. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. **Epidemiol Infect**, v. 133, n. 6, p. 959-78, Dec 2005.

WHO. Fact sheets: Food safety and foodborne illness., 2007.

YOUNG, S. D.; OLUSANYA, O.; JONES, K. H.; LIU, T.; LILJEBJELKE, K. A.; HOFACRE, C. L. *Salmonella* Incidence in Broilers from Breeders Vaccinated with Live and Killed *Salmonella*. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, n. 4, p. 521-528, Winter 2007 2007a.

ZHANG-BARBER, L.; TURNER, A. K.; BARROW, P. A. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. **Vaccine**, v. 17, n. 20-21, p. 2538-45, Jun 4 1999.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de vacinas acompanhou a evolução da avicultura e, certamente, foi um dos fatores responsáveis pela viabilidade desta atividade, já que o desenvolvimento de novas tecnologias na produção de vacinas auxiliaram no controle de muitas enfermidades. Porém, o desenvolvimento de vacinas realmente efetivas contra bactérias de interesse econômico ou de saúde pública, como é o caso da *Salmonella*, permanece um desafio a ser vencido pelos pesquisadores.

Os anticorpos maternos avaliados no presente estudo, não foram capazes de impedir a infecção das progênes por *Salmonella* em nenhum dos programas vacinais. Entretanto não podemos dizer que esses anticorpos foram ineficientes, já que, ao contrário de outros trabalhos de nosso laboratório, não foi possível realizar a contagem de *Salmonella* em nosso estudo, onde o isolamento somente foi conseguido após enriquecimento em meios seletivos. Além disso, acredito que o maior benefício do uso de vacinas inativadas é impedir a transmissão vertical desse agente e não podemos deixar de destacar que após o uso de uma vacina inativada conta *Salmonella* Enteritidis em reprodutoras no Brasil (2003), houve significativa redução da presença desse agente em nossos plantéis.

Também se percebeu uma significativa mudança na dinâmica celular, principalmente na expressão de células caliciformes, linfócitos T CD4+ e T CD8+ na mucosa intestinal das aves vacinadas e/ou desafiadas neste estudo. De posse desses resultados, recomendam-se estudos mais aprofundados sobre os mecanismos genéticos responsáveis pela expressão dessas células, bem como seu comportamento frente a diferentes desafios e formas de proteção. É possível que o conhecimento da expressão de células do sistema imune adaptativo possa auxiliar

na resistência das progênies frente a desafios iniciais por *Salmonella*, e ser considerado em estudos sobre a liberação do uso de vacinas vivas.

Apesar de não haver um consenso mundial sobre o uso ou não de vacinas vivas contra *Salmonella*, não existe dúvida quanto à eficácia desses produtos. É possível que associação de vacinas vivas e inativadas possam auxiliar no controle desse agente. Isso pode beneficiar não somente a cadeia de produção do frango de corte, mas outras atividades como a criação de perus e aves de postura comercial.

## ANEXOS

### ANEXO I

#### ARCHIVES OF VETERINARY SCIENCE: APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

\*Para agilizar a tramitação e publicação de seu artigo, recomendamos fortemente que as normas sejam obedecidas, inclusive para as referências\*

1. **Digitação:** O artigo com no máximo vinte e cinco páginas deverá ser digitado em folha com tamanho A4 210 x 297 mm, com margens laterais direita, esquerda, superior e inferior de 2,5 cm. As páginas deverão ser numeradas de forma progressiva no canto superior direito. Deverá ser utilizado fonte arial 12 em espaço duplo; em uma coluna. Tabelas e Figuras com legendas serão inseridas diretamente no texto e não em folhas separadas.

2. **Identificação dos autores e instituições (máximo 6 autores por artigo):** Todos os dados referentes a autores devem ser inseridos exclusivamente nos metadados no momento da submissão online. Não deve haver nenhuma identificação dos autores no corpo do artigo enviado para a revista. Os autores devem inclusive remover a identificação de autoria do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista.

3. **Tabelas:** Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte superior da tabela em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título. (Ex.: Tabela 1 – Título.). As abreviações devem ser descritas em notas no rodapé da tabela. Estas serão referenciadas por números sobrescritos (1,2,3). Quando couber, os cabeçalhos das colunas deverão possuir as unidades de medida. Tanto o título quanto as notas de rodapé devem fazer parte da tabela, inseridos em "linhas de tabela".

4. **Figuras:** Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte inferior da figura em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título (Ex.: Figura 1 – Título). As designações das variáveis X e Y devem ter iniciais maiúsculas e unidades entre parênteses. São admitidas apenas figuras em preto-e-branco. Figuras coloridas terão as despesas de clicheria e impressão a cores pagas pelo autor. Nesse caso deverá ser solicitada ao Editor (via ofício) a impressão a cores.

#### NORMAS EDITORIAIS

**Artigo completo** - Deverá ser inédito, escrito em idioma português (nomenclatura oficial) ou em inglês. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimento(s) (quando houver); Nota informando aprovação por Comitê de Ética (quando houver); Referências.

**Artigo de Revisão** - Os artigos de revisão deverão ser digitados seguindo a mesma norma do artigo científico e conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Agradecimento(s) (quando houver); Referências. A publicação de artigos de revisão fica condicionada à relevância do tema, mérito científico dos autores e disponibilidade da Revista para publicação de artigos de Revisão.

#### ESTRUTURA DO ARTIGO

**TÍTULO** - em português, centralizado na página, e com letras maiúsculas. Logo abaixo, título em inglês, entre parêntesis e centralizado na página, com letras minúsculas e itálicas. Não deve ser precedido do termo título.

**RESUMO** - no máximo 1800 caracteres incluindo os espaços, em língua portuguesa. As informações devem ser precisas e sumarizar objetivos, material e métodos, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço duplo. Deve ser precedido do termo "Resumo" em caixa alta e negrito.

**PALAVRAS-CHAVE** – inseridas abaixo do resumo. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título, e alinhado a esquerda. Não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo “Palavras-chave” em caixa baixa e negrito.

**ABSTRACT** - deve ser redigido em inglês, refletindo fielmente o resumo e com no máximo 1800 caracteres. O texto deve ser justificado e digitado em espaço duplo, em parágrafo único. Deve ser precedido do termo “Abstract” em caixa alta e negrito.

**KEY WORDS** - inseridas abaixo do abstract. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título em inglês, e alinhado a esquerda. Não precisam ser traduções exatas das palavras-chave e não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo “Key words” em caixa baixa e negrito.

**INTRODUÇÃO** – abrange também uma breve revisão de literatura e, ao final, os objetivos. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Introdução” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

**MATERIAL E MÉTODOS** - o autor deverá ser preciso na descrição de novas metodologias e adaptações realizadas nas metodologias já consagradas na experimentação animal. Fornecer referência específica original para todos os procedimentos utilizados. Não usar nomes comerciais de produtos. O texto deverá iniciar sob a primeira letra do termo “Material e Métodos” (escrito em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

**RESULTADOS** (O item Resultados e o item Discussão podem ser apresentados juntos, na forma RESULTADOS e DISCUSSÃO, ou em itens separados)

o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Resultados” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Símbolos e unidades devem ser listados conforme os exemplos: Usar 36%, e não 36 % (não usar espaço entre o no e %); Usar 88 kg, e não 88Kg (com espaço entre o no e kg, que deve vir em minúsculo); Usar 42 mL, e não 42 ml (litro deve vir em Maiúsculo, conforme padronização internacional); Usar 25oC, e não 25 oC (sem espaço entre o no e oC ); Usar ( $P < 0,05$ ) e não ( $p < 0,05$ ); Usar  $r^2 = 0,89$  e não  $r^2=0,89$ ; Nas tabelas inserir o valor da probabilidade como “valor de P”; Nas tabelas e texto utilizar média  $\pm$  desvio padrão ( $15,0 \pm 0,5$ ). Devem ser evitadas abreviações não-consagradas, como por exemplo: “o T3 foi maior que o T4, que não diferiu do T5 e do T6”. Este tipo de redação é muito cômodo para o autor, mas é de difícil compreensão para o leitor. Escreva os resultados e apresente suporte com dados. Não seja redundante incluindo os mesmos dados ou resultados em tabelas ou figuras.

**DISCUSSÃO** - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Discussão” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Apresente a sua interpretação dos seus dados. Mostre a relação entre fatos ou generalizações reveladas pelos seus resultados. Aponte exceções ou aspectos ainda não resolvidos. Mostre como os seus resultados ou interpretações concordam com trabalhos previamente publicados ou discordam deles, mas apresente apenas trabalhos originais, evitando citações de terceiros. Discuta os aspectos teóricos e/ou práticos do seu trabalho. Pequenas especulações podem ser interessantes, porém devem manter relação factual com os seus resultados. Afirmações tais como: “Atualmente nós estamos tentando resolver este problema...” não são aceitas. Referências a “dados não publicados” não são aceitas. Conclua sua discussão com uma curta afirmação sobre a significância dos seus resultados.

**CONCLUSÕES** - preferencialmente redigir a conclusão em parágrafo único, baseada nos objetivos. Devem se apresentar de forma clara e sem abreviações. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Conclusão” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

**AGRADECIMENTOS** - os agradecimentos pelo apoio à pesquisa serão incluídos nesta seção. Seja breve nos seus agradecimentos. Não deve haver agradecimento a autores do trabalho. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Agradecimento” (escrita em caixa baixa).

**NOTAS INFORMATIVAS** - quando for o caso, antes das referências, deverá ser incluído parágrafo com informações e número de protocolo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética e ou Biossegurança. (quando a Comissão de Ética pertencer à própria instituição onde a pesquisa foi realizada, deverá constar apenas o número do protocolo).

REFERÊNCIAS - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra "Referências" (escrita em caixa alta e negrito). Omitir a palavra bibliográficas. Alinhada somente à esquerda. Usar como base as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (NBR 10520 (NB 896) - 08/2002). Devem ser redigidas em página separada e ordenadas alfabeticamente pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es). Os destaques deverão ser em NEGRITO e os nomes científicos, em ITÁLICO. NÃO ABREVIAR O TÍTULO DOS PERIÓDICOS. Indica-se o(s) autor(es) com entrada pelo último sobrenome seguido do(s) prenome(s) abreviado (s), exceto para nomes de origem espanhola, em que entram os dois últimos sobrenomes. Mencionam-se os autores separados por ponto e vírgula. Digitá-las em espaço simples e formatá-las segundo as seguintes instruções: no menu FORMATAR, escolha a opção PARÁGRAFO... ESPAÇAMENTO...ANTES...6 pts.Exemplo de como referenciar:

#### ARTIGOS DE PERIÓDICOS:

(citar os 3 primeiros autores seguido de "et al.")

JOCHLE, W.; LAMOND, D.R.; ANDERSEN, A.C. et al. Mestranol as an abortifacient in the bitch. *Theriogenology*, v.4, n.1, p.1-9, 1975.

Livros e capítulos de livro. Os elementos essenciais são: autor(es), título e subtítulo (se houver), seguidos da expressão "In:", e da referência completa como um todo. No final da referência, deve-se informar a paginação. Quando a editora não é identificada, deve-se indicar a expressão *sine nomine*, abreviada, entre colchetes [s.n.]. Quando o editor e local não puderem ser indicados na publicação, utilizam-se ambas as expressões, abreviadas, e entre colchetes [S.l.: s.n.].

#### REFERÊNCIA DE LIVROS (*in totum*):

BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. *Small animal practice*. Philadelphia : W.B. Saunders, 1997. 1467 p.

#### REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo com autoria)

SMITH, M. Anestrus, pseudopregnancy and cystic follicles. In: MORROW, D.A. *Current Therapy in Theriogenology*. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1986, Cap.x, p.585-586.

#### REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo sem autoria)

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In \_\_\_\_\_. *Sampling techniques*. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4., p.72-90.

OBRAS DE RESPONSABILIDADE DE UMA ENTIDADE COLETIVA: A entidade é tida como autora e deve ser escrita por extenso, acompanhada por sua respectiva abreviatura. No texto, é citada somente a abreviatura correspondente. Quando a editora é a mesma instituição responsável pela autoria e já tiver sido mencionada, não é indicada.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. *Official methods of analysis*. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. *Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG*. Versão 8.0. Viçosa, MG, 2000. 142p.

#### REFERÊNCIA DE TESE/DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA:

BACILA, M. *Contribuição ao estudo do metabolismo glicídico em eritrócitos de animais domésticos*. 1989. Curitiba, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

#### REFERÊNCIA DE PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS:

KOZICKI, L.E.; SHIBATA, F.K. Perfil de progesterona em vacas leiteiras no período do puerpério, determinado pelo radioimunoensaio (RIA). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXIV., 1996, Goiânia. Anais... Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária, 1996, p. 106-107.

RESTLE, J.; SOUZA, E.V.T.; NUCCI, E.P.D. et al. Performance of cattle and buffalo fed with different sources of roughage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. Proceedings... São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1994. p.301-303.

REFERÊNCIA DE ARTIGOS DE PERIÓDICOS ELETRÔNICOS: Quando se tratar de obras consultadas *on-line*, são essenciais as informações sobre o endereço eletrônico, apresentado entre

os sinais < >, precedido da expressão “Disponível em: xx/xx/xxxx” e a data de acesso do documento, precedida da expressão “Acesso em: xx/xx/xxxx.”

PRADA, F.; MENDONÇA Jr., C. X.; CARCIOFI, A. C. [1998]. Concentração de cobre e molibdênio em algumas plantas forrageiras do Estado do Mato Grosso do Sul. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.35, n.6, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/> Acesso em: 05/09/2000.

MÜELLER, Suzana Pinheiro Machado. A comunicação científica e o movimento de acesso livre ao conhecimento. *Ciência da Informação*, Brasília, v. 35, n. 2, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-19652006000200004&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-19652006000200004&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 13/05/2007.

REBOLLAR, P.G.; BLAS, C. [2002]. Digestión de la soja integral em ruminantes. Disponível em: [http://www.ussoymeal.org/ruminant\\_s.pdf](http://www.ussoymeal.org/ruminant_s.pdf). Acesso em: 12/10/2002.

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. [1996]. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URPe, 4., 1996, Recife. Anais eletrônico... Recife: Universidade Federal do Pernambuco, 1996. Disponível em: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm> Acesso em: 21/01/1997.

CITAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS EM CD ROM: Na citação de material bibliográfico publicado em CD ROM, o autor deve proceder como o exemplo abaixo:

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. Anais... São Paulo: Gmosis, 1999, 17par. CD-ROM. Forragicultura. Avaliação com animais. FOR-020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Bases de dados em Ciência e Tecnologia. Brasília, n. 1, 1996. CD-ROM.

E.mail Autor, < e-mail do autor. “Assunto”, Data de postagem, e-mail pessoal, (data da leitura)

Web Site Autor [se conhecido], “Título”(título principal, se aplicável), última data da revisão [se conhecida], < URL (data que foi acessado)

FTP Autor [se conhecido] “Título do documento”(Data da publicação) [se disponível], Endereço FTP (data que foi acessado)

CITAÇÕES NO TEXTO: As citações no texto deverão ser feitas em caixa baixa. Quando se tratar de dois autores, ambos devem ser citados, seguido apenas do ano da publicação; três ou mais autores, citar o sobrenome do primeiro autor seguido de et al. obedecendo aos exemplos abaixo:

Silva e Oliveira (1999)

Schmidt et al. (1999)

(Silva et al., 2000)